

Intrinsische Substratproteine der Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis*:

Identifizierung und Charakterisierung

vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Susan Schmidt

aus Großröhrsdorf

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Berichterstatterin: | Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Mikrobiologie, TU Darmstadt |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer
Biochemie, Hochschule Darmstadt |
| 3. Berichterstatter: | Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff
Botanik, TU Darmstadt |

Tag der Einreichung: 13.06.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2008

Darmstadt 2008

D17

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2004 bis Juni 2008 am Fachbereich Chemie- und Biotechnologie der Hochschule Darmstadt unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer in Kooperation mit Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer vom Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen:

Patentanmeldungen:

Fuchsbauer, H.-L., Schmidt, S. & Pfeifer, F., Strukturmodulatoren von Proteinen, Deutsche Patentanmeldung 10 2007 044 296.5 (17.09.2007).

Fuchsbauer, H.-L., Schmidt, S. & Pfeifer, F., Transglutaminasesubstrat mit Inaktivierungsaktivität für Serin- und Metalloproteasen sowie antibiotischen Eigenschaften, Deutsche Patentanmeldung 10 2007 045 627.3 (24.09.2007).

Fuchsbauer, H.-L., Sarafeddin, A., Schmidt, S., Adolf, F. & Mainusch, M., Transglutaminasesubstrat mit Inaktivierungsaktivität für Metalloproteasen sowie antibiotischen Eigenschaften, Deutsche Patentanmeldung 10 2007 047 038.1 (01.10.2007).

Fuchsbauer, H.-L., Sarafeddin, A., Schmidt, S., Mainusch, M., Jüttner, N., Bleischwitz, M. & Kaldenhoff, R., Transglutaminasesubstrat mit Inaktivierungsaktivität für Cystein- und Serinproteasen sowie antibiotischen Eigenschaften, Deutsche Patentanmeldung 10 2007 048 423.3 (09.10.2007).

Publikationen:

Schmidt, S., Adolf, F. & Fuchsbauer, H.-L. (2008). The transglutaminase activating metalloprotease inhibitor from *Streptomyces mobaraensis* is a glutamine and lysine donor substrate of the intrinsic transglutaminase. FEBS Lett. **582**, 3132-3138.

Sarafeddin, A., Schmidt, S., Adolf, F., Mainusch, M., Bender, A. & Fuchsbauer, H.-L. (2008). A novel transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis* triggers autolysis of neutral metalloproteases. Manuscript.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Streptomyceten	2
2.2 Bakterielle Transglutaminasen	10
2.2.1 Vorkommen	10
2.2.2 Aktivierung der bakteriellen Transglutaminase von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	13
2.2.3 Charakteristika und Katalysemechanismus der bakteriellen Transglutaminase von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	16
2.3 Substrate der bakteriellen Transglutaminase	20
2.3.1 Nachweismethoden für Transglutaminase-Substrate	20
2.3.2 Substrate und Anwendung der Transglutaminase von Streptomyceten	21
2.4 Zielsetzungen der Arbeit	23
3. Material und Methoden.....	25
3.1 Material	25
3.1.1 Mikroorganismen	25
3.1.2 Feinchemikalien und Lösungsmittel	25
3.1.3 Verbrauchsmaterialien und Kits	27
3.1.4 Enzyme, Peptide und Proteine	28
3.1.5 Materialien für chromatographische Verfahren	28
3.1.6 Antikörper und Seren	28
3.2 Geräte	29
3.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen	29
3.2.2 Chromatographische Verfahren	29
3.2.3 Konzentrierung von Proteinlösungen	29
3.2.4 Bestimmung von Proteinkonzentration und Enzymaktivität	30
3.2.5 Elektrophoretische und immunchemische Verfahren	30
3.3 Methoden zur Kultivierung	31
3.3.1 Nährmedien	31
3.3.2 Kultivierung von <i>Streptomyces mobaraensis</i> auf Agarmedium	32
3.3.3 Kultivierung von <i>Streptomyces mobaraensis</i> in Flüssigmedium	32
3.3.4 Herstellung von Sporensuspension	33
3.3.5 Ermittlung der Lebendkeimzahl einer Sporensuspension	33
3.3.6 Stammkonservierung	33
3.4 Bestimmung der Enzymaktivität von Transglutaminase	34
3.4.1 Prinzip und Reagenzien	34
3.4.2 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität in 1,5 ml Reaktionsgefäßen	35
3.5 Konzentrierung, Entsalzen und Teilreinigung von Proteinlösungen	36
3.5.1 Ethanol-Fällung	36
3.5.2 Ultrafiltration	37
3.5.3 Lyophilisation	37
3.5.4 Dialyse	37
3.5.5 Entsalzen mittels Gelfiltration	37

3.6	Reinigung von Proteinen von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	38
3.6.1	Auswahl des geeigneten Ionenaustauschers	39
3.6.2	Isolation von Transglutaminase und deren Substraten aus Kulturüberstand.....	39
3.7	Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen	40
3.7.1	Analytische Tris-Glycin-Gele	41
3.7.2	Boratgele.....	42
3.7.2.1	Protein-Molekulargewichtsstandards	43
3.7.3	Isoelektrische Fokussierung	44
3.7.3.1	Markerproteine für die isoelektrische Fokussierung.....	45
3.8	Visualisierung von Proteinen	46
3.8.1	Coomassie Brilliant Blau-Färbung	46
3.8.2	Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen	46
3.8.3	Silberfärbung von IEF-Gelen	47
3.9	Immunchemische Methoden.....	48
3.9.1	Herstellung polyklonaler Antikörper	48
3.9.2	Isolierung von IgG aus Kaninchenserum	49
3.9.3	Dot Blot	50
3.9.4	Western Blot	50
3.9.5	Immunchemische Färbung.....	51
3.10	Molekulargewichtsbestimmungen	53
3.10.1	SDS-PAGE.....	53
3.10.2	Gelpermeationschromatographie.....	53
3.11	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure	54
3.12	Bestimmung von Proteaseaktivität.....	55
3.12.1	Anson-Casein-Test.....	55
3.12.2	Aktivitätstest für P1-Proteasen.....	58
3.12.3	Fluoreszenz-Aktivitätstest für P1'-Endoproteasen mit Dabcyl-Ser-Phe-EDANS	60
3.12.4	Inhibierungsversuche	61
3.12.4.1	Bestimmung von Inhibitorkonstanten	62
3.13	Methoden zur Sequenzanalyse auf Aminosäureebene	63
3.13.1	Trennung von Proteinen mittels Borat-Gelelektrophorese und Transfer auf PVDF-Membranen	63
3.13.2	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Proteine	65
3.14	Identifizierung physiologischer Substratproteine von bakterieller Transglutaminase	65
3.14.1	Mechanischer Zellaufschluss	65
3.14.2	Nachweis physiologischer Substratproteine durch enzymatischen Einbau von Fluoreszenz- oder biotinylierten Markern sowie Polymerisation	66
3.14.3	Gewinnung eines fluoreszierenden Zellwandpolymers.....	69
3.14.4	Unterdrückung der Quervernetzung durch Transglutaminase mit Cadaverin	70
4.	Ergebnisse	71
4.1	Unterdrückung der enzymatischen Proteinvernetzung mit Cadaverin	72
4.1.1	Untersuchungen am Modellsubstrat α_{S1} -Casein	72
4.1.2	Untersuchungen zum Nachweis von Transglutaminase-Substraten in Agar- und Flüssigmedium	73
4.2	Untersuchungen zum Nachweis von Transglutaminase-Substraten in der Zellwand	77

4.3	Untersuchungen zum Nachweis von Transglutaminase-Substraten mit Antikörpern gegen das Zellwandpolymer	80
4.4	Screening nach weiteren Transglutaminase-Substraten	83
4.5	Reinigung extrazellulärer Transglutaminase-Substrate von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	84
4.6	Untersuchung der Substrateigenschaften von SSTI und DAIP.....	89
4.6.1	Untersuchungen mit biotinylierten Markern	89
4.6.2	Nachweis im Zellwandpolymer	93
4.6.3	Polymerisierungsversuche mit SSTI und DAIP.....	94
4.7	Charakterisierung der Transglutaminase-Substrate.....	96
4.7.1	Eigenschaften von SSTI	96
4.7.2	Eigenschaften von DAIP	104
4.8	Substratmodulatoren der Transglutaminase	109
4.8.1	Entdeckung.....	109
4.8.2	Einfluss der Modulatoren auf Transglutaminase und deren Substrate.....	111
4.8.3	Einfluss der Modulatoren auf Fremdproteine.....	122
5.	Diskussion	126
6.	Literaturverzeichnis	137
7.	Anhang.....	151
7.1	Identifizierung von Proteinen aus dem Zellwandpolymer von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	151
7.2	Danksagung.....	153
7.3	Lebenslauf	154
7.4	Erklärung.....	155

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. <i>bide</i> st.	Wasser, doppeltdestilliert
A. <i>dest</i> .	Wasser, destilliert
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
B.	<i>Bacillus</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
Bz-	Benzoyl-
Cad	Cadaverin
CBZ/Cbz	Carbobenzoxymethyl (siehe Z)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
CM	Carboxymethyl
cm ³	Kubikzentimeter
C-Terminus	Ende eines Proteins o. Polypeptids mit freier Carboxygruppe
°C	Grad Celsius
d	Tag
Da	Dalton (relative Atommasse)
DAIP	Dispase-Autolyse induzierendes Protein
DEAE	Diethylaminoethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Dt. Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alteri (lat. und alle)
FPLC	Fast Protein-Liquid Chromatography
FTG	Fisch-Transglutaminase
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GPC	Gelpermeationschromatographie
GYM	Glucose Yeast Malt
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
i. Vak.	im Vakuum
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
JCM	Japan Collection of Microorganisms
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
K	Kontrolle
K _i	Inhibitorkonstante
KÜ	Kulturüberstand
l	Liter
LPA	N-(3-Dimethylamino)propylauramid
LS	N-Lauroylsarcosin
M	Molar
m ²	Quadratmeter
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization – Time of flight
mbar	Millibar
Mbp	Megabasenpaare

mg	Milligramm
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mU	Milli-Unit
MWCO	molecular weight cut off, Ausschlussgrenze
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
N-Terminus	Ende eines Proteins o. Polypeptids mit freier Aminogruppe
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
pM	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	<i>para</i> -Nitroanilid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
S.	<i>Streptomyces</i>
ScNPI	<i>Streptomyces caespitosus</i> neutral proteinase inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGMP II	<i>Streptomyces griseus</i> Metalloendopeptidase II
SIL	Subtilisin inhibitor like
sp.	Spezies
SPI	<i>Streptomyces</i> Papain Inhibitor
SSI	<i>Streptomyces</i> Subtilisin Inhibitor
SSTI	<i>Streptomyces</i> Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor
subsp.	Subspezies
Suc-	Succinyl-
Tab.	Tabelle
TAMEP	Transglutaminase aktivierende Metalloprotease
TAP	Tripeptidyl-Aminopeptidase
TBST	Tris-buffered Saline Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG, TGase	Transglutaminase
TMAE	Trimethylaminoethyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
V	Volt
Vol	Volumen
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent (volumenbezogen)
W	Watt
Z	Benzyloxycarbonyl
ZT	Zimmertemperatur
ZWF	Zellwandfraktion

1. Zusammenfassung

Unter den Actinomyceten ist *Streptomyces* die am meisten studierte und am besten bekannte Gattung. Die multizellulären Bakterien besiedeln normalerweise den Boden, sind dort Modulatoren der mikrobiellen Flora und wichtige Zersetzer. Ihre Besonderheit ist ein den Pilzen ähnliches, filamentöses Wachstum, eine komplexe Zelldifferenzierung von Substrat- und Luftmycel und eine Reproduktion durch Sporen. Innerhalb der Gattung gibt es Mitglieder, die wie *Streptomyces mobaraensis* Transglutaminase (TGase) exportieren. Das ubiquitär vorkommende Enzym erzeugt hoch vernetzte Proteinaggregate durch Ausbildung von Isopeptidbindungen zwischen Lysin- und Glutaminresten. Bakterielle und eukaryotische TGasen unterscheiden sich dabei in ihrer Struktur und Abhängigkeit von Ca^{2+} . Über die physiologische Funktion der Enzyme von Streptomyceten ist bisher nichts bekannt. Ziel der Arbeit war es deshalb, intrinsische Substratproteine von TGase zu identifizieren und zu charakterisieren. Entdeckt wurden der *Streptomyces* Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor (SSTI) und das Dispase-Autolyse induzierende Protein (DAIP) von *S. mobaraensis*. Beide Proteine besitzen reaktive Glutamin- und Lysinreste, die jedoch während der submersen Kultivierung durch TGase modifiziert werden. Seitenkettenhydrolyse von SSTI- und DAIP-Glutaminen verhinderte den Einbau eines biotinylierten Amins. Bei DAIP wird zusätzlich die Lysinreaktivität maskiert, wahrscheinlich durch die Ausbildung von Salzbrücken mit den gebildeten Glutamaten. Daher war eine Vernetzung beider Proteine nur möglich, wenn sie vor Aktivierung der intrinsischen TGase aus Kulturüberständen isoliert wurden. Überraschend war die Entdeckung von Substratmodulatoren der TGase. Die Lipoaminosäure N-Lauroylsarcosin und das Lipopolyamin N-(3-Dimethylamino)propyllauramid exponieren offenbar kryptische Glutamine oder in Salzbrücken befindliche Lysine und verbessern so die Vernetzbarkeit der Proteine. Selbst inaktivierte Proteine erhalten ihre Substrateigenschaften zurück. Das bereits gut charakterisierte Substrat SSTI ist ein doppelköpfiger Inhibitor, der die TGase aktivierende Metalloprotease TAMEP inhibiert und eine weitere Bindungsstelle für die Serinproteasen Subtilisin und Trypsin besitzt. DAIP ist ein bisher unbekanntes Protein, das neutrale Metalloproteasen wie Dispase in eine Autolyse treibt. Natürliche Strukturanaloga der beiden Substratmodulatoren mit antibiotischen Eigenschaften sind bereits beschrieben. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass beide Proteine zusammen mit noch zu identifizierenden Substratmodulatoren Teile eines Abwehrsystems sind, das für den Schutz der Lufthyphen von *S. mobaraensis* errichtet wird.

2. Einleitung

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle von Transglutaminase im komplexen Lebenszyklus von *Streptomyces mobaraensis* zu liefern. Von besonderem Interesse waren hierbei die Identifizierung physiologischer Substrate des extrazellulären Enzyms und deren Charakterisierung.

2.1 Streptomyceten

Bei Bakterien der Gattung *Streptomyces* handelt es sich um Gram-positive, filamentöse, ubiquitär vorkommende Bodenmikroorganismen, die zu den heterogenen Actinomyceten gehören. In dieser Klasse sind bisher über 500 Arten und Unterarten beschrieben, und sie enthält damit die größte Zahl kultivierbarer Arten in der Domäne Bacteria (Hain *et al.* 1997). Streptomyceten sind aerobe, chemoorganotrophe Eubakterien mit einem hohen GC-Gehalt von durchschnittlich 74 Prozent (Stackebrandt & Woese 1984).

Der Bekanntheitsgrad der Actinomyceten beruht auf der Vielfalt der von ihnen gebildeten hydrolytischen Enzymen wie Amylasen, Chitinasen, Cellulasen, Ligninasen, Lipasen und Proteasen, die eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung organischer Materialien im Waldboden spielen. Die Produktion dieser vielen verschiedenen Enzyme stellt einen wichtigen industriellen Einsatzbereich der Actinomyceten dar, die bei der Kompostierung, dem Biomasseabbau sowie der Nahrungsmittelkonservierung verwendet werden (Piret & Demain 1988). Außerdem produzieren Streptomyceten eine Vielzahl bioaktiver, niedermolekularer Sekundärmetabolite (Korn-Wendisch & Kutzner 1981). Von besonderem Interesse sind hierbei die über 4000 natürlich vorkommenden Antibiotika, unter denen es auch viele medizinisch relevante gibt, z. B. Tetracycline, β -Lactame oder Aminoglycoside (Okami & Hotta 1988). Neben Antibiotika werden aber auch noch eine große Anzahl anderer wichtiger Wirksubstanzen gebildet, zu denen Anthelmintika, Cytotoxine, Immundepressiva, aber auch Fungizide und Herbizide zählen. Ihren Einsatz finden diese Substanzen sowohl in der Human- und Veterinärmedizin als auch in Land- und Forstwirtschaft. Ein weiterer bekannter Sekundärmetabolit ist das ätherische Öl Geosmin, welches den charakteristischen Waldbodengeruch hervorruft.

Streptomyceten weisen einen morphologisch komplexen Lebenszyklus auf (Abb. 2.1), der durch filamentöses Wachstum mit Zelldifferenzierung charakterisiert ist, welche die Bildung eines sehr verzweigten Substrat- und Luftmycels sowie die anschließende Sporulation umfasst. Streptomyceten besitzen eine prokaryotische zelluläre Organisation, haben jedoch bezüglich ihrer strukturellen Komplexität und multizellulären Differenzierung ähnliche Eigenschaften wie höhere Organismen (Bruton *et al.* 1995, Miguélez *et al.* 2000, Kelemen *et al.* 2001).

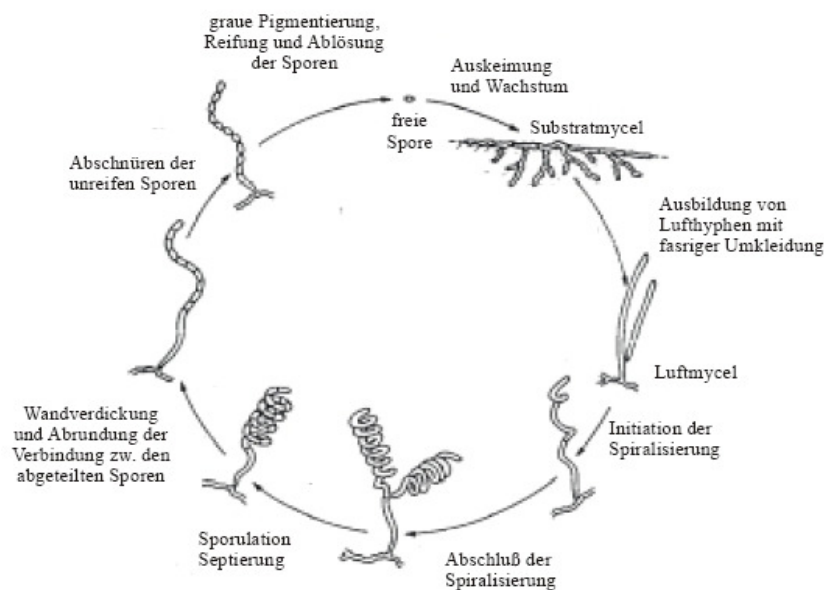


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der morphologischen Differenzierung von Streptomyceten anhand des Entwicklungszyklus nach Chater & Merrick (1979).

Bei guten Wachstumsbedingungen kommt es zum Auskeimen der Spore unter Ausbildung von ein bis zwei Keimschläuchen (Hardisson *et al.* 1978). In der ersten Wachstumsphase bildet sich dann das filamentöse, verzweigte vegetative oder Substratmycel, welches das Medium oberflächlich und durch Wachstum nach innen besiedelt (Kalakoutskii & Agre 1976, Hodgson 1992). Die Verlängerung der Hyphen findet apikal hauptsächlich durch Zellwandausdehnung statt, und diese verzweigen zu einer komplexen, eng verwobenen Matrix aus Filamenten mit einem ungefähren Durchmesser von 0,5 – 1 µm. Besonders an den Wachstumsspitzen kann es zum Auftreten von Hyphenkompartimenten kommen, die durch unregelmäßig vorkommende, dünne, einschichtige vegetative Septen gebildet werden und mehrere Genomkopien enthalten (Chater 1989a, Chater 1993). Diese kompartimentisierten Hyphen bestehen aus alternierenden lebenden und toten Segmenten, die in geordneten Mustern absterben (Manteca *et al.* 2005a). Die Hyphen durchdringen das Medium, indem sie organische

Moleküle durch extrazelluläre hydrolytische Enzyme aufschließen. Die filamentöse Morphologie ermöglicht es den Streptomyceten somit, feste Substrate im Boden effizienter zu kolonisieren als unbewegliche, einzellige Mikroorganismen (Miguélez *et al.* 2000). Im Substratmycel werden in am weitesten von der Wachstumszone entfernten Teilen der Kolonie verschiedene Arten von Speicherstoffen akkumuliert, z. B. Glycogen, Lipide und Polyphosphate, was durch eine sinkende Wachstumsrate aufgrund von Nährstofflimitierung hervorgerufen wird (Brana *et al.* 1986).

Diese führt unter normalen Laborbedingungen je nach Kultivierung und Art der Streptomyceten nach ein bis zwei Tagen zur Ausbildung der Luftmycelien (Sporophoren), welche sich parasitierend auf dem Substratmycel bilden und die für die Reproduktion notwendigen Sporen (Conidien) bilden. In dieser Wachstumsphase lysieren viele Zellen des Substratmycels, und es kommt zu einer Wiederverwertung akkumulierter Speicherstoffe und Makromoleküle wie DNA und Proteine (Wildermuth 1970, Méndez *et al.* 1985, Brana *et al.* 1986). Als Ursprung der Lufthyphen, die senkrecht in die Höhe wachsen, treten spezialisierte Verzweigungen aus der Oberfläche der Kolonie hervor. Bei diesen „Inseln“, die sich fortschreitend ausbreiten, handelt es sich um die verbliebenen lebenden Segmente der kompartimentisierten Hyphen des Substratmycels (Manteca *et al.* 2005a, b, 2006). Das Wachstum der Hyphen findet nicht nur an den Spitzen, sondern auch in den Innenbereichen des Luftmycels statt, wo neue Hyphen durch Verzweigung bereits vorhandener entstehen. Dadurch sind die Lufthyphen in der Innenzone auch wesentlich verzweigter als in den oberen Regionen des Luftmycels (Miguélez *et al.* 1994). Das bedeutet, dass Nährstoffe intrazellulär über beträchtliche Distanzen vom Substratmycel zu den wachsenden Hyphen an der Spitze der Kolonie transportiert werden müssen. Allerdings gibt es auch in den Lufthyphen Kompartimente, die durch Septen getrennt sind (Wildermuth & Hopwood 1970), welche aus einer elektronendichten Schicht von Zellwandmaterial und zwei Membranen bestehen, deren äußere Oberflächen durch einen Einstülpungsprozess einander zugewandt sind (Locci & Sharples 1984). Das Zellwandmaterial scheint jedoch keine Barriere für den Nährstoffdurchtritt zu sein, da es oft durch feine Poren perforiert zu sein scheint (Brana *et al.* 1981, Locci & Sharples 1984). Es ist jedoch noch nicht klar, wie sich die Nährstoffe durch zwei Membranen unterschiedlicher Polaritäten bewegen können.

An diesem weiteren Schritt der morphologischen Differenzierung sind nach neuesten Erkenntnissen im wesentlichen drei separate Gruppen von Proteinen als morphogenetische Faktoren für die Ausbildung von Lufthyphen bei *Streptomyces*

coelicolor notwendig, die Rodline, die Chapline und SapB (Elliot & Talbot 2004). Die Oberfläche der Lufthyphen und Sporen ist bei vielen *Streptomyces* sp. mit einem charakteristischen Rodlet-Muster bedeckt, welches aus 8 – 10 nm großen, parallelen Stäbchen besteht. An der Bildung dieser sogenannten „Rodlet-Schicht“ sind zwei sehr ähnliche Proteine, die Rodline RdIA und RdIB genannt werden, beteiligt. Die Gene *rdIA* und *rdIB* werden nur während der Lufthyphenbildung exprimiert und wurden in einer Vielzahl von *Streptomyces* Spezies identifiziert (Claessen *et al.* 2002, 2004). Die Expression dieser Gene, wie auch die der Chaplin-Gene, ereignet sich früh in den lebensfähigen Teilen des kompartmentisierten Mycels, was zeigt, dass diese Segmente als die frühen Vorläufer der Lufthyphen erachtet werden sollten (Manteca *et al.* 2007). Rodlin-Deletionsmutanten behalten die Fähigkeit hydrophobe Lufthyphen und Sporenketten zu bilden, obwohl die Rodlet-Ultrastruktur auf deren Oberfläche fehlt und sie stattdessen ein Gitter kleinerer Fibrillen (4 – 6 nm) aufweisen. Allerdings können sich diese Mutanten weniger gut an hydrophobe Oberflächen anheften (Elliot & Talbot 2004). Eine weitere Familie sekretierter Proteine sind die Chapline (*coelicolor* hydrophobic aerial proteins), die eine wesentliche Rolle für die Oberflächenhydrophobizität und somit für die Entwicklung der Lufthyphen bei *S. coelicolor* spielen (Claessen *et al.* 2003, Elliot *et al.* 2003). Es gibt acht Chapline (ChpA – H), die alle eine hochkonservierte, ca. 40 Aminosäuren lange hydrophobe Domäne gemeinsam haben, die sogenannte „Chaplin-Domäne“. ChpD – H sind kurze Proteine mit nur einer Chaplin-Domäne, ChpA – C hingegen sind länger, besitzen zwei dieser Domänen und ein C-terminales „Sortier-Signal“, welches sie zum Zielmolekül für Sortasen macht. Sortasen sind Transpeptidasen, welche spezielle C-terminale Motive erkennen, die Proteine dort schneiden und dann kovalent in das Peptidoglycan der Zellwand einbauen (Mazmanian *et al.* 1999). Lange Chapline werden somit kovalent in der Zellwand verankert, die kurzen möglicherweise durch Heteroassemblierung der Chaplindomänen der langen mit denen der kurzen Proteine. Wahrscheinlich gibt es auch Interaktionen von Rodlinen und Chaplinen (Elliot & Talbot 2004). Die Chapline sind essentiell für die Lufthyphenbildung und Sporulation, da ein Verlust von vier Genen zu Verzögerungen in diesem Entwicklungsschritt führt, eine Deletion aller acht Gene zu extrem schwerwiegenden Defekten bei gleichzeitigem Verlust der Oberflächenhydrophobizität (Claessen *et al.* 2004). Zusätzlich sind Chaplintranskripte in *bld*-Mutanten nahezu nicht detektierbar (Elliot *et al.* 2003). *Bld*-Mutanten (engl. bald für nackt) sind Entwicklungsmutanten, die nicht in der Lage sind Luftmycel zu bilden und ein „nacktes“ Erscheinungsbild, im Gegensatz zum watteähnlichen, weißen des Wildtyps, haben (Kelemen & Buttner 1998, Chater & Horinouchi 2003). Die Mehrzahl der *bld*-Gene

kodiert für regulatorische Proteine (Merrick 1976, Miguélez *et al.* 1992, Elliot *et al.* 1998, Nodwell *et al.* 1999, Bibb *et al.* 2000, Chater 2001, Elliot *et al.* 2001, Nguyen *et al.* 2003, Takano *et al.* 2003). Chapline sind reich an β -Faltblattstrukturen und besitzen die Fähigkeit zur Selbstassemblierung unter Ausbildung amyloid-ähnlicher Fibrillen. Außerdem sind sie oberflächenaktiv, da sie die Oberflächenspannung von Wasser von 72 auf 26 mJ/m² senken können, was wichtig für die Aufrichtung von Hyphen aus wässriger Umgebung in die Luft ist (Claessen *et al.* 2003). Die Chapline allein sind aber nicht ausreichend für die Aufrichtung der Lufthyphen.

Studien mit *bld*-Mutanten zeigten, dass dafür ein weiteres Protein, SapB (spore associated Protein B; Guijarro *et al.* 1988) notwendig ist, welches bei diesen Mutanten die Fähigkeit, Lufthyphen zu bilden, wiederherstellt (Willey *et al.* 1991). Allerdings bleibt die Lufthyphen-Differenzierung mit der Kapazität zur Sporulation beeinträchtigt (Tillotson *et al.* 1998). SapB ist ein kleines, hydrophobes Peptid, welches, ähnlich wie Chapline, oberflächenaktive Eigenschaften besitzt, da es die Oberflächenspannung von Wasser an der Wasser-Luft-Grenzfläche von 72 auf 32 mJ/m² senken kann (Tillotson *et al.* 1998). Ursprünglich wurde SapB von der Sporenoberfläche isoliert, kommt aber in deutlich größerer Menge im Kulturmedium vor. Im Gegensatz dazu sind Chapline hauptsächlich in den Luftstrukturen zu finden. Nur zwei Chapline, ChpE und ChpH, wurden jemals im Medium nachgewiesen (Elliot & Talbot 2004). Die Produktion von SapB findet nur auf reichhaltigem Medium statt (Willey *et al.* 1991). SapB ist das prozessierte Produkt des *ramS* Gens, welches zum *ram* (rapid aerial mycelium) Gencluster gehört, das aus dem *ramCSAB* Operon und dem divergent exprimierten *ramR* besteht (Ma & Kendall 1994). Ein orthologes Cluster wurden in *S. griseus* gefunden, das *amf* (aerial mycelium formation) Cluster (Ueda *et al.* 1993). RamR ist ein Response-Regulator ähnliches Proteine, welches die Expression des *ramCSAB* Operons kontrolliert (Keijser *et al.* 2002, Nguyen *et al.* 2002, O'Connor *et al.* 2002). *ramS* codiert ein 42 Aminosäuren großes Peptid, den SapB-Vorläufer (Kodani *et al.* 2004), und *ramA* und *ramB* codieren Komponenten eines ABC-Transporters. Das prognostizierte Produkt von *ramC* hat N-terminal Homologien zu Serin/Threonin-Kinasen, ist membranassoziiert (Hudson *et al.* 2002), 904 Aminosäuren lang und besitzt eine Domäne, die für die Homodimerisierung nötig ist (Hudson & Nodwell 2004). Wahrscheinlich modifiziert RamC RamS, indem es über den C-Terminus Lanthioninbrücken zwischen den Resten 3 und 10 sowie 13 und 20 des reifen SapB herstellt (Willey *et al.* 2006), da dort Ähnlichkeiten mit C-terminalen Domänen von Enzymen des LanM-Typs gezeigt werden konnten (Kodani *et al.* 2004). Lantibiotika besitzen antimikrobielle Eigenschaften, was bei SapB allerdings nicht der Fall

ist (Kodani *et al.* 2004), sodass es eher als Lantibiotika-ähnliches oder Lan-enthaltendes Peptid angesehen werden sollte (Willey *et al.* 2006). Bei *S. griseus* spielt A-Faktor (2-Isocapryloyl-3R-hydroxymethyl- γ -butyrolacton) als „hormoneller Regulator“ eine Rolle bei der Antibiotikaproduktion, aber auch bei der morphologischen Differenzierung (Horinouchi & Beppu 1994, Horinouchi 1996). Er diffundiert frei in den Hyphen und induziert die Expression von AdpA, indem er an ein A-Faktor Rezeptor Protein (ArpA) am *adpA* Promoter bindet und dieses vom Promoter dissoziiert (Ohnishi *et al.* 1999). AdpA induziert dann die Transkription verschiedener Gene aus Sekundärmetabolismus und Morphogenese. Dazu gehört *adsA*, welches einen ECF (extracytoplasmatic function) Sigmafaktor (σ^{AdsA}) der RNA-Polymerase codiert (Yamazaki *et al.* 2000), der nur in die morphologische Entwicklung involviert ist. Das Ortholog zu *adsA* in *S. coelicolor* ist *bldN*, welches die gleiche Rolle wie *adsA* spielt (Bibb *et al.* 2000). Das Gen von SgmA wird bei *S. griseus* ebenfalls von AdpA kontrolliert, welches eine extrazelluläre Metalloendopeptidase (SGMP II) codiert (Kato *et al.* 2002). Diese scheint in die morphologische Entwicklung involviert zu sein. Außerdem werden die Gene einiger extrazellulärer Serinproteasen unter AdpA-Einfluss transkribiert (Kato *et al.* 2005, Tomono *et al.* 2005). Auch das *amfS*-Gen von *S. griseus* wird durch den A-Faktor und AdpA reguliert. Es codiert AmfS, ein extrazelluläres peptidisches Morphogen (Ueda *et al.* 2002) und gehört zum *amf*-Gencluster, welches als Regulator für den Beginn der Lufthyphenbildung dient (Ueda *et al.* 1993). Es hat die gleiche Organisation, wie das *ram*-Gencluster in *S. coelicolor* A3(2) und *S. lividans* und scheint die gleiche Rolle in der Luftmycelbildung zu spielen (Referenzen in Kelemen & Buttner 1998, Chater 2001). Das Model der Proteinaktivität bei der Lufthyphenbildung nach Elliot & Talbot (2004) ist in Abb. 2.2 dargestellt.

In der letzten Entwicklungsphase stoppt das Wachstum der Lufthyphen, und synchron in regelmäßigen Abständen gebildete Querwände unterteilen die Hyphenspitzen in viele Kompartimente. Jedes enthält jeweils eine Chromosomenkopie des gleichen Genoms und ist dazu bestimmt, eine robuste, austrocknungsresistente Spore zu werden (Chater 1998, Kelemen & Buttner 1998, Champness 2000). Diese Sporulationssepten sind morphologisch verschieden zu den vegetativen Querwänden im Substratmycel und bestehen normalerweise aus zwei Membranschichten, die von einer Doppelschicht Zellwandmaterial getrennt sind, was die Separation benachbarter, hydrophober Sporen erlaubt (Locci & Sharples 1984).

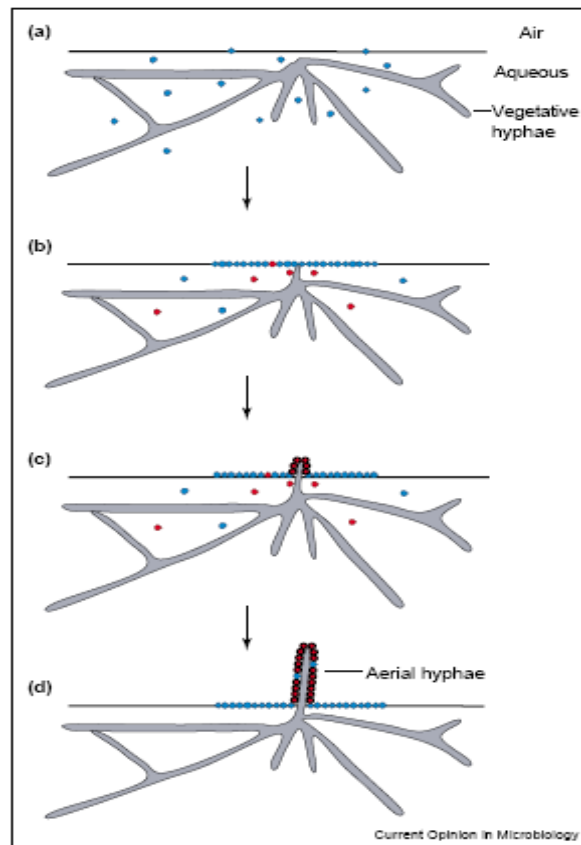


Abb. 2.2: Model der morphogenetischen Proteinaktivität bei der Bildung der Lufthyphen von *S. coelicolor* (nach Elliot & Talbot, 2004). Während des vegetativen Wachstums (a, b) wird SapB (blaue Punkte) sekretiert und sammelt sich an der Wasser-Luft-Grenzfläche (schwarze Linie) zu einer amphiphilen Schicht. Das reduziert die Oberflächenspannung und ermöglicht die Entstehung von Lufthyphen. Chaplinsynthese und -sekretion (rote Punkte) beginnt während der späten vegetativen Phase (b) und setzt sich während des Lufthyphenwachstums fort (c, d). Die Chapline aggregieren, um den Lufthyphen eine hydrophobe Hülle zu geben, was das weitere Wachstum in die Luft erleichtert.

Zur Beendigung des Wachstums und dem Beginn der Sporulation könnte laut Chater (1993) ein reduzierter osmotischer Druck assoziiert mit der Bildung von Glycogen aus Glucose-1-phosphat beitragen. Neben Glycogen treten noch andere Speicherstoffe in den sporulierenden Teilen der Lufthyphen auf, z. B. Trehalose, die 12% des Trockengewichtes der Sporen ausmacht, aber nur 2% der vegetativen Hyphen (Brana *et al.* 1986), kugelförmige, elektronentransparente Lipidkörperchen oder elektronendichte Granula aus Polyphosphaten (Locci & Sharples 1984). Später, wenn das Glycogen wieder degradiert wird, könnte der damit verbundene Anstieg des osmotischen Druckes dabei helfen, die Form der zylindrischen Sporenkompartimente zu ellipsoidalen Sporen zu ändern (Chater 1989b). In dieser Phase verdickt sich die Sporenwand und bei den meisten Spezies wird ein graues Pigment in die Wand eingelagert (Chater 1993). Sporen von *Streptomyces* werden normalerweise nur in Lufthyphen auf festem Medium und von sporogenen Hyphen im Flüssigmedium gebildet. Einige Mutanten können aber auch in Substrathyphen auf Festmedium oder in vegetativen Hyphen im Flüssigmedium

sporulieren, was darauf hindeutet, dass alle Hyphen potentiell zu Sporen differenzieren können (Ohnishi *et al.* 2002). An der Sporulation bei *S. coelicolor* sind die *whi*-Gene beteiligt, die für Zellteilung und Sporenreifung in den Lufthyphen erforderlich sind (Chater 1972). *Whi*-Mutanten (engl. white für weiß) bilden zwar Luftmycel, sind aber nicht in der Lage normale, reife Sporen zu bilden. Deshalb bleiben sie weiß, anstatt die normale graue Oberflächenfarbe auszubilden, die durch ein Polyketidpigment, welches sich in der Sporenwand befindet, verliehen wird. Es gibt frühe und späte *whi*-Mutanten, wobei die frühen Mutanten keine Sporulationssepten bilden können (Chater 2001). Zu den frühen Genen gehört auch *whiG*, welches einen Sigmafaktor für die RNA-Polymerase codiert, die das Entwicklungsprogramm initiiert, das zur Sporenbildung aus den Lufthyphen führt (Kelemen & Buttner 1998). In Abwesenheit von σ^{WhiG} bilden sich keine Sporulationssepten, ist σ^{WhiG} im Überschuss vorhanden, kommt es zur Hypersporulation auf festem Medium und gelegentlicher ektopischer Sporulation in vegetativen Hyphen sowohl auf festem als auch in flüssigem Medium (Chater *et al.* 1989).

Aufgrund morphologischer und biochemischer Unterschiede der Sporophoren und reifen Sporen ist es möglich, die Streptomyceten weiter zu differenzieren. 1958 unterteilte Baldacci die Familie *Streptomycetaceae* in die Gattung *Streptomyces* und die taxonomisch eigenständige Gattung *Streptoverticillium* mit ihren markanten, wirtelartig verzweigten Sporophoren. Aufgrund von 16S rRNA-Analysen wurden die Streptoverticillien 1990 durch Witt und Stackebrandt wieder in die Gattung *Streptomyces* eingegliedert. Als Modellorganismus für die Gruppe der Actinomyceten ist der bereits oben erwähnte *S. coelicolor* A3(2) besonders gut untersucht. 2002 wurde das vollständige Genom sequenziert (Bentley *et al.* 2002). Es handelt sich um ein 8,7 Mbp großes lineares Chromosom mit der größten Anzahl von Genen, die in einem Bakterium bisher entdeckt wurde. Viele der 7825 vorausgesagten Gene codieren für Sekundärmetabolite, es gibt eine noch nicht beobachtete Fülle an regulatorischen Genen und viele duplizierte Gene, die wahrscheinlich „gewebsspezifische“ Isoformen codieren, welche in den verschiedenen Entwicklungsphasen wirksam werden. Weitere wissenschaftlich relevante Streptomyceten sind *S. griseus*, *S. lividans*, *S. avermitilis* und *S. lavendulae*. Der von unserer Arbeitsgruppe untersuchte *S. mobaraensis* gehört allerdings zur ehemaligen Gattung *Streptoverticillium* und unterscheidet sich von den oben genannten Arten unter anderem durch die Bildung des Enzyms Transglutaminase, welches sowohl von wissenschaftlichem als auch industriellem Interesse ist.

2.2 Bakterielle Transglutaminasen

2.2.1 Vorkommen

Transglutaminasen (TGase; Protein-Glutamin: Amin γ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) gehören zur Enzymklasse der Transferasen und kommen ubiquitär vor. So wurden sie unter anderem bei Vertebraten (Chung & Folk 1972, Wong et al. 1990, Weraarchakul-Boonmark et al. 1992, Grant et al. 1994, Yasueda et al. 1994), Invertebraten und Mollusken (Tokunaga et al. 1993, Singh & Mehta 1994, Nozawa et al. 1997), Pflanzen (Icekson & Apelbaum 1987, Serafini-Fracassini et al. 1988, Margosiak et al. 1990, Kang & Cho 1996) und Mikroorganismen (Ando et al. 1989, Klein et al. 1992, Ruiz-Herrera et al. 1995) nachgewiesen. Bei Wirbeltieren existieren meist mehrere TGase-Isoformen, die in unterschiedlichen Gewebearten vorkommen (Mehta 2005). Am besten charakterisiert sind die Gewebetransglutaminase (TG_G, TG₂), die aus einem Homogenisat von Meerschweinchenleber isoliert und als erste TGase beschrieben wurde (Clarke et al. 1957) und die humane Plasmatransglutaminase (Faktor XIII), die Fibrin zu unlöslichen Blutgerinnseln polymerisiert (Greenberg et al. 1991). 1989 wurde von Ando et al. erstmals eine bakterielle TGase aus dem Kulturmedium von *Streptoverticillium* sp. S-8112 isoliert, welcher als eine Variante von *Streptoverticillium mobaraense* (*S. mobaraensis*) identifiziert wurde. Die von Kanaji et al. 1993 bestimmte Aminosäuresequenz des Enzyms zeigt kaum signifikante Homologien zu Faktor XIII-artigen TGasen oder anderen gelisteten Sequenzen aktueller Proteinsequenz-Datenbanken, außer zur offenbar homologen TGase von *S. cinnamoneus* (Duran et al. 1998). Bis heute wurden einige weitere bakterielle TGasen identifiziert, die meisten davon stammen ebenfalls von Streptomyceten (Andou et al. 1993, Duran et al. 1998, Pasternack 1998, Umezawa et al. 2002, Lin et al. 2006, Liu et al. 2006, Langston et al. 2007, Cui et al. 2007). Die Proteinsequenzen von sieben dieser TGasen sind bei ExPASy – UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) gelistet, die von *S. fervens* supsp. *melosporus* wurde im Rahmen der Dissertation von Pasternack 1998 bestimmt und ist in keiner Datenbank aufgeführt. Eine multiple Alignierung der Sequenzen durch ClustalW wurde ab dem Startpunkt der proTGase von *S. mobaraensis* (Pasternack et al. 1998) und dem möglichen Start der proTGasen der anderen Streptomyceten nach der voraussichtlichen Schnittstelle einer Gram-positiven Signalpeptidase (van Roosmalen et al. 2004) durchgeführt. Es zeigte sich, dass große Bereiche konserviert sind (Abb. 2.3, grau unterlegt). Auch die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren Cystein, Aspartat und Histidin liegen bei allen Enzymen konserviert vor (Abb. 2.3, farblich hervorgehoben).

(1)	-DNGAGEETK	SYAETYLRLTA	DDVANINALN	ESAPAAS---	-----SA	GPSFRAP-DS	DDRVTPPAEP	57
(2)	AGSSDGEKKG	SYAATHGLTA	DDVDNINALN	EEALAVGQPG	KPPTGFPPSA	GPSLRAPAFD	DDRVTPPAEP	70
(3)	ASSGDGEEKG	SYAETHGLTA	DDVESINALN	ERALTILGQPG	KPPKELPPSA	SAPSRAP--S	DDRETPPAEP	68
(4)	ASRGDGEWEG	SYAETHGLTA	EDVKNINALN	KRALTAGQPG	NSAAELPPSA	SALFRAPDAA	DDRVTPPAEP	70
(5)	AGSGDRGEGK	SYAETHGLTA	DDVKNINALN	ESALTPEQPG	RSPGELPPSA	SPSSRAPGST	DDRETPPAEP	70
(6)	ASGGDEEWEG	SYAATHGLTA	EDVKNINALN	KRALTAGQPG	NFPAELPPSA	TALFRAPDAA	DDRVTPPAEP	70
(7)	ASGGDGEWEG	SYAETHDLTA	EDVKNINALN	KRALTAGQPG	NSPAELSPSA	SALFRAPDAV	DDRVTPPAEP	70
(8)	ADSGDGAKKG	SYAETHGLTA	HDVKNINALN	ERAPALGQPG	KPPAGAPP--	---FRTPALV	DDRETPPAEP	65
(1)	LDRMPDPYRP	SYGRAETVVN	NYIRKWQQVY	SHRDGRKQOM	TEEQREWLSY	GCVGVTWVNS	GQYPTNRLAF	127
(2)	LDRMPDAYRA	YGGRAATTVIN	NYIRKWQQVY	SHRDGKIRQM	TEEQREKLSY	GCVGVTWANS	GPYPTNRLAF	140
(3)	LDRMPDAYRA	YGGRAATTVIN	NYIRKWQQVY	SHRDGKKQOM	TEEQREKLSY	GCVGVTWVNS	GPYPTNRLAF	138
(4)	LNRMPDAYRA	YGGRAATTVIN	NYIRKWQQVY	SQRGGNQOM	TEEQREQLSY	GCVGVTWVNT	GPYPTNRLAF	140
(5)	LERMPDAYRA	YGGRAATTVIN	NYIRKWQQVY	SHRDGKKQOM	TEEQREKLSY	GCVGVTWVNS	GPYPTNRLAF	140
(6)	LSRMPDAYRA	NGGRAATTVIN	NYIRKWQQVY	SQRGGSQOM	TEEQREQLSY	GCVGVTWVNT	GPYPTNRLAF	140
(7)	LNRMPDAYRA	YGGRAATTVIN	NYIRKWQQVY	SQRGGNQOM	TEEQREQLSY	GCVGVTWVNT	GPYPTNRLAF	140
(8)	LDRMPDAYRA	YGGRAATTVIN	NYIRKWQQVY	SQRDGGKQOM	TEEQRENLSY	GCVGVTWVNS	GFYPTNRLAF	135
(1)	ASFDEDRFKN	ELKNGRPRSG	ETRAEFEGRV	AKESFDEEKG	FKRAREVASV	MNRALENAHD	ESAYLDNLKK	197
(2)	ASFDEDKYRN	NLKNSSPGLG	ETRAEFEGRI	AKASFDERAG	FKRARDVAAI	MNKALENAHD	EGTYIDHLKT	210
(3)	ASFDENKYKN	DLKNTSPRPD	ETRAEFEGRI	AKGSFDEGKG	FKRARDVASV	MNKALENAHD	EGTYINNHLKT	208
(4)	AFDENKYKN	DLENSRFPQN	ETQAEFEGRI	AKGSFDEGKG	FKRAREVASV	MNKALDSAH	EGTYIDHLKT	210
(5)	ASFDENKYKN	DLKNISPRPG	ETRAEFEGRI	AKDSFDEEKG	FKRARDVASI	MNKALSAHD	EGAYIDNLKT	210
(6)	AFDENKYKN	DLENSRFRPN	ETQAEFEGRI	AKDSFDEAKG	FKRAREVASV	MNKALENAHD	EGTYIDHLKT	210
(7)	AFDENKYKN	DLENSRFRPN	ETQAEFEGRI	AKDSFDEGKG	FKRAREVASV	MNKALDNAHD	EETTYIGHLKT	210
(8)	AFDENKYKN	DLKNTSPRPD	ETRAEFEGRI	AKASFDEGKG	FKRARDVASI	MNKALENAPD	EGTYLKNLKT	205
(1)	ELANGNDALR	NEDARSFFYS	ALRNTSPFKE	RNGGNHDPSP	MKAVIYSKHF	WSGQDRSSSA	DKRKYGDPEA	267
(2)	ELTNNNDALL	QEDTSNFFYS	ALRNTSPFKE	RDGGNYDPSK	MKAVIYSKHF	WSGQDRRGSD	DKRKYGDPEA	280
(3)	ELTNNNDALL	REDSRSNFFYS	ALRNTSPFKE	RDGGNYDPSK	MKAVIYSKHF	WSGQDQRGSS	DKRKYGDPEA	278
(4)	ELANKNDALL	YEDSRSSFYS	ALRNTSPFKE	RDGGNYDPSK	MKAVVYSKHF	WSGQDPRGSS	DKRKYGDPEA	280
(5)	GLTNNNDALL	YEDSRSNFFYS	ALRNTSPFKE	RDGGNYDPSK	MKAVIYSKHF	WSGQDQRGPS	DKRKYGDPEA	280
(6)	ELTNKNDALL	YEDSRSNFFYS	ALRNTSPFKE	RDGGNYDPSK	MKAVVYSKHF	WSGQDQRDSS	DKRKYGDPEA	280
(7)	ELANKNDALL	YEDSRSSFYS	ALRNTSPFKE	RDGGNYDPSK	MKAVVYSKHF	WSGQDQRGSS	EKRKYGDPEA	280
(8)	DLTNKNDALL	HEDSRSNFFYS	ALRNTSPFRE	RDGGNYDPSK	MKAVIYSKHF	WSGQDQRGSA	DKRKYGDPEA	275
(1)	FRPAPGTGLV	DMSRDRNIPR	SPTSPEGFV	NFDYGWFGAQ	TEADADKTVW	THGNHYHAPN	GSLGAMHVYE	337
(2)	FRPDQRTGLV	DMSKDRNIPR	SPARSGESVW	NFDYGWFGAQ	TEADPGQTIW	THGDHYHAPN	GSLGPMHVYE	350
(3)	FRPDQRTGLV	DMSKDRSIPR	SPAKPGEVW	NFDYGWFGAQ	TEADADKTIW	THGDHYHAPN	SDLGPMHVYE	348
(4)	FRPDQRTGLV	DMSRDRNIPR	SPAKPGEVW	NFDYGWFGAQ	AEADADKTVW	THANHYHAPN	GGMGPMNVYE	350
(5)	FRPAQGTGLV	DMSKDRSIPR	SPANAGESVW	NFDYGWFGAQ	TEADADKTVW	THGDHYHAPN	GSLGPMHVYE	350
(6)	FRPDQRTGLV	DMSRDRNIPR	SPAKPGEVW	NFDYGWFGAQ	AEADADKTIW	THANHYHAPN	G-MGPMNVYE	349
(7)	FRPDQRTGLV	DMSRDRNIPR	SPAKPGEVW	NFDYGWFGAQ	AEADADKTVW	THANHYHAPN	GGMGPMNVYE	350
(8)	FRPDQRTGLV	DMSKDRNIPR	SPARPEGVW	NFDYGWFGAQ	TAADADETIW	THGDHYHAPN	GSLGPMHVYE	345
(1)	SKFRNWSAGY	ADFDRCAYVI	TFIPKSWNTA	PDKVKQGW	376			
(2)	SKFQNSAGY	EDFDRCAYVI	TFIPKSLNTA	PAKV-----	384			
(3)	SKFRKWSAGY	ADFDRCAYVI	TFIPKSWNTA	PAKVEQGW	387			
(4)	SKFRNWSAGY	ADFDRCAYVI	TFIPKSWNTA	PAEVKQGW	389			
(5)	SKFRNWSAGY	ADFDRCAYVI	TFIPKSWNTA	PAKVQGW	389			
(6)	SKFRNWSAGY	ADFDRCAYVI	TFIPKSWNTA	PAEVKQGW	388			
(7)	SKFRNWSAGY	ADFDRCAYVI	TFIPKSWNTA	PAEVKQGW	389			
(8)	SKFRKWSAGY	ADFDRCAYVI	TFIPKSWNTA	PDKVEQGW	384			

Abb. 2.3: Multiple Alignment aller bei ExPASy - UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) gelisteten TGase-Proteinsequenzen von Streptomyceten und der nicht gelisteten Sequenz von *S. fervens* supsp. *melosporus* ab dem möglichen Start der protTGase durch ClustalW (www.ebi.ac.uk). Konservierte Bereiche sind grau unterlegt. Die an der Katalyse beteiligten AS sind hervorgehoben (Cys rot, Asp blau, His grün). (1): *S. mobaraensis* (accession number P81453), (2): *S. fervens* supsp. *melosporus* (in keiner Datenbank gelistet, Pasternack 1998), (3): *S. cinnamoneus* (accession number Q8GR90), (4): *S. paucisporogenes* (accession number A5PHK4), (5): *S. roseovorticillatus* (accession number A5PHK2), (6): *S. caniferus* (accession number A5PHK3), (7): *S. platensis* (accession number Q6Q6T1), (8): *S. fradiae* (accession number Q0GYU0).

Die erwarteten Aminosäuresequenzen der reifen TGasen der einzelnen Streptomyceten weisen untereinander Homologien zwischen 77% und 96% auf und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Arten der ehemaligen Gattung *Streptovercillium* (Sequenzen 1 – 5) und der Gattung *Streptomyces* (Sequenzen 6 – 8) (Tab. 2.1). Die möglichen Startpunkte der reifen Sequenzen wurden analog der von Zotzel et al. 2003b ermittelten Schnittstelle einer Tripeptidyl-Aminopeptidase (TAP) von *S. mobaraensis* bestimmt, auf die in Abschnitt 2.2.2 näher eingegangen wird.

Tab. 2.1: Prozentuale Aminosäurehomologie der reifen TGasen verschiedener Streptomyceten (ClustalW).

Sequenz A	Accession Nummer	Name	Länge (AS)	Sequenz B	Accession Nummer	Name	Länge (AS)	Homologie (%)
1	P81453	<i>S. mobaraensis</i>	331	2	-	<i>S. fervens</i> supsp. <i>melosporus</i>	327	77
1	P81453	<i>S. mobaraensis</i>	331	3	Q8GR90	<i>S. cinnamoneus</i>	330	81
1	P81453	<i>S. mobaraensis</i>	331	4	A5PHK4	<i>S. paucisporogenes</i>	332	79
1	P81453	<i>S. mobaraensis</i>	331	5	A5PHK2	<i>S. roseovercillatus</i>	332	80
1	P81453	<i>S. mobaraensis</i>	331	6	A5PHK3	<i>S. caniferus</i>	331	79
1	P81453	<i>S. mobaraensis</i>	331	7	Q6Q6T1	<i>S. platensis</i>	332	79
1	P81453	<i>S. mobaraensis</i>	331	8	Q0GYU0	<i>S. fradiae</i>	332	78
2	-	<i>S. fervens</i> supsp. <i>melosporus</i>	327	3	Q8GR90	<i>S. cinnamoneus</i>	330	85
2	-	<i>S. fervens</i> supsp. <i>melosporus</i>	327	4	A5PHK4	<i>S. paucisporogenes</i>	332	81
2	-	<i>S. fervens</i> supsp. <i>melosporus</i>	327	5	A5PHK2	<i>S. roseovercillatus</i>	332	86
2	-	<i>S. fervens</i> supsp. <i>melosporus</i>	327	6	A5PHK3	<i>S. caniferus</i>	331	82
2	-	<i>S. fervens</i> supsp. <i>melosporus</i>	327	7	Q6Q6T1	<i>S. platensis</i>	332	80
2	-	<i>S. fervens</i> supsp. <i>melosporus</i>	327	8	Q0GYU0	<i>S. fradiae</i>	332	84
3	Q8GR90	<i>S. cinnamoneus</i>	330	4	A5PHK4	<i>S. paucisporogenes</i>	332	86
3	Q8GR90	<i>S. cinnamoneus</i>	330	5	A5PHK2	<i>S. roseovercillatus</i>	332	91
3	Q8GR90	<i>S. cinnamoneus</i>	330	6	A5PHK3	<i>S. caniferus</i>	331	86
3	Q8GR90	<i>S. cinnamoneus</i>	330	7	Q6Q6T1	<i>S. platensis</i>	332	86
3	Q8GR90	<i>S. cinnamoneus</i>	330	8	Q0GYU0	<i>S. fradiae</i>	332	91
4	A5PHK4	<i>S. paucisporogenes</i>	332	5	A5PHK2	<i>S. roseovercillatus</i>	332	84
4	A5PHK4	<i>S. paucisporogenes</i>	332	6	A5PHK3	<i>S. caniferus</i>	331	95
4	A5PHK4	<i>S. paucisporogenes</i>	332	7	Q6Q6T1	<i>S. platensis</i>	332	96
4	A5PHK4	<i>S. paucisporogenes</i>	332	8	Q0GYU0	<i>S. fradiae</i>	332	83
5	A5PHK2	<i>S. roseovercillatus</i>	332	6	A5PHK3	<i>S. caniferus</i>	331	86
5	A5PHK2	<i>S. roseovercillatus</i>	332	7	Q6Q6T1	<i>S. platensis</i>	332	84
5	A5PHK2	<i>S. roseovercillatus</i>	332	8	Q0GYU0	<i>S. fradiae</i>	332	88
6	A5PHK3	<i>S. caniferus</i>	331	7	Q6Q6T1	<i>S. platensis</i>	332	95
6	A5PHK3	<i>S. caniferus</i>	331	8	Q0GYU0	<i>S. fradiae</i>	332	85
7	Q6Q6T1	<i>S. platensis</i>	332	8	Q0GYU0	<i>S. fradiae</i>	332	84

Weitere Beispiele für bakterielle TGasen sind der Cytotoxische Nekrotisierende Faktor 1 (CNF 1) von *Escherichia coli* und das homologe dermonekrotische Toxin von *Bordetella pertussis*, die spezifische Glutamine in tierischen Rho-GTPasen deamidieren, aber auch TGase-Aktivität aufweisen (Horiguchi et al. 1997, Schmidt et al. 1998). Und auch bei Archaea und Cyanobakterien konnten TGase-ähnliche Sequenzen in sequenzierten Genomen gefunden werden, wobei bei den meisten dieser Proteine deren enzymatische Aktivität noch nicht gezeigt werden konnte und sie nicht funktionell charakterisiert

wurden (Makarova et al. 1999). Bei *Bacillus subtilis* stellten Kobayashi et al. TGase-Aktivität in sporulierenden Zellen fest (1998a) und identifizierten ein einzelnes *tgI* Gen von dieser Spezies (1998b). Die vom Gen abgeleitete Proteinsequenz zeigte kaum Ähnlichkeiten zu anderen TGasen von *Streptovorticillium* sp. oder Säugern. 2000 konnten Suzuki et al. eine TGase von *B. subtilis* Sporen isolieren und charakterisieren, wobei auch gezeigt werden konnte, dass die von Kobayashi et al. (1998b) abgeleitete Aminosäuresequenz mit der N-terminale Sequenz des isolierten Proteins übereinstimmt. Es gibt Beweise, dass die TGase von *B. subtilis* und die von ihr gebildeten Quervernetzungen im Sporenmantel vorhanden sind (Kobayashi et al. 1996, Kobayashi et al. 1998a, Zilhão et al. 2005). Außerdem konnte mit dem Sporenhüllprotein GerQ wahrscheinlich ein Substrat der *B. subtilis* TGase identifiziert werden, da eine TGase-vermittelte Quervernetzung des Proteins im Sporenmantel stattfindet (Ragkousi & Setlow 2004). Des Weiteren konnten Monroe und Setlow 2006 zeigen, dass GerQ ein Lysindonor ist und jedes der drei Lysine am N-Terminus des Proteins für die Bildung von Quervernetzungen im Sporenmantel notwendig ist. Kobayashi et al. 1998a wiesen auch bei anderen *Bacillus* Arten in sporulierenden Zellen TGase-Aktivität nach. Ein weiteres Enzym konnte von einem *B. circulans* Stamm aus dem Amazonas isoliert und charakterisiert werden (de Barros Soares et al. 2003).

2.2.2 Aktivierung der bakteriellen Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis*

Aufgrund der Analyse des Gens der TGase von *Streptovorticillium* S-8112 vermuteten Washizu et al. 1994, dass das Enzym ein sekretorisches Protein mit einem hydrophoben Signalpeptid von 18 AS, einem Propeptid von 57 AS und einem reifen Enzym von 331 AS ist. Als Prozessierungsstelle wurde nach Vergleichen mit dem N-Terminus der reifen TGase die Peptidbindung zwischen Pro⁷⁵ und Asp⁷⁶ vorhergesagt. 1998 konnte das Pro-Enzym von Pasternack et al. aus dem Kulturmedium 1 – 2 Tage alter *S. mobaraensis*-Kulturen isoliert und charakterisiert werden. Dabei wurden in der von Washizu et al. 1994 bestimmten Sequenz des Propeptids Sequenzfehler nachgewiesen und korrigiert. In späteren Arbeiten wurde zusätzlich die Sequenz des Signalpeptids der TGase von *S. mobaraensis* auf DNA-Ebene bestimmt (Fuchsbauer, persönliche Mitteilung). Danach ergab sich für das Prä- und Propeptid eine Länge von 31 bzw. 45 AS. Die vermutete Prozessierungsstelle des Propeptids verschob sich entsprechend um eine AS auf Pro⁷⁶-Asp⁷⁷. Die Primärsequenz der TGase von *S. mobaraensis* ist in Abb. 2.4 dargestellt.

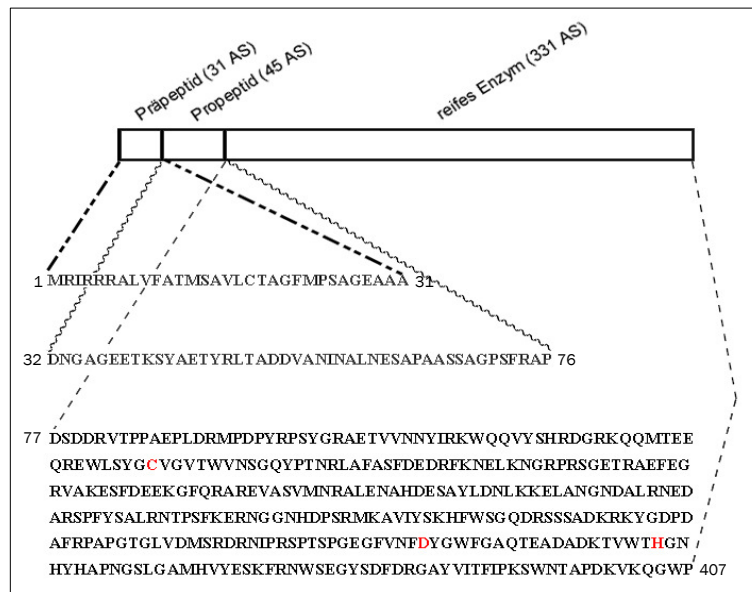


Abb. 2.4: Darstellung der Primärstruktur der Präprotransglutaminase von *S. mobaraensis*. Rot markiert sind die im Aktivzentrum befindlichen essentiellen Aminosäuren Cystein, Aspartat und Histidin (Kanaji et al. 1993, Kashiwagi et al. 2002).

Die TGase besitzt den typischen Aufbau sekretorischer Proteine von Gram-positiven Bakterien, die durch die Plasmamembran aus der Zelle transportiert werden (Economou 1999, Braun et al. 1999). Am N-Terminus der Vorläuferproteine befindet sich ein Signalpeptid, welches die Proteine zum Sekretionsapparat (Sec-System) in der Plasmamembran lotst und nach der Translokation unter ATP-Verbrauch von spezifischen Signalpeptidasen abgespalten wird (Simonen & Palva 1993, Nakamura et al. 1999). Die charakteristische Struktur solcher Signalpeptide besteht aus einem basischen, positiv geladenen N-Terminus, gefolgt von einem hydrophoben Kern und einer Spaltstelle mit der Erkennungssequenz für Signalpeptidasen (van Roosmalen et al. 2004). Typisch bei Gram-positiven, sekretorischen Proteinen sind auch Propeptide zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Enzym. Sie können sich sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus oder an beiden befinden (Pohlner et al. 1987, Terada et al. 1990, Wandersman 1989). Ihre Funktion ist sehr unterschiedlich und reicht von der Steigerung der Sekretionsgeschwindigkeit, Verankerung des reifen Proteins in der Zellwand, Schutz des reifen Proteins vor zellassoziierten Proteasen, Faltungshilfe bei der Bildung des reifen Proteins (intramolekulares Chaperon) bis zur intrazellulären Hemmung der eigenen Aktivität zum Schutz der Zelle (Ohta & Inouye 1990, Baker et al. 1993, Demleitner & Götz 1994, Navarre & Schneewind 1999, Fu et al. 2000). Bei der TGase hat das Propeptid wahrscheinlich zwei Funktionen, zum einen die Stabilisierung der Proteinstruktur als intramolekulares Chaperon und zum anderen die Inaktivierung der enzymatischen Aktivität zum Schutz der Zelle vor unkontrollierter Vernetzung intrazellulärer Proteine

mittels sterischer Blockade des Aktivzentrums (Kashiwagi *et al.* 2002). Die proTGase von *S. mobaraensis* wird durch die proteolytische Abspaltung des Propeptids durch die endogene TGase aktivierende Metalloprotease (TAMEP) aktiviert. Das Enzym wurde 2003 von Zotzel *et al.* identifiziert und charakterisiert. Anhand der N-terminalen Sequenz wurde es der M4-Familie von Metalloproteasen zugeordnet (Tsuyuki *et al.* 1991). Außerdem wurden Sequenzhomologien zur Zn^{2+} -abhängigen Endoprotease SGMP II von *S. griseus* gefunden, die durch EDTA und gegen das Aktivzentrum gerichtete Inhibitoren gehemmt werden kann (Kumazaki *et al.* 1994, Kojima *et al.* 1998). Weiterhin besitzt das Enzym eine Bindestelle für SSI (*Streptomyces* Subtilisin Inhibitor), wobei dieses Polypeptid in *S. griseus* fehlt (Kuramoto *et al.* 1996). TAMEP und SGMP II scheinen nahe verwandt zu sein, da TAMEP auch durch EDTA und ein SSI-ähnliches Polypeptid von *S. mobaraensis* inhibiert wird. SSI-ähnliche proteinöse Proteaseinhibitoren sind bei Streptomyceten weit verbreitet (Taguchi *et al.* 1992, 1993a, 1993b). Phylogenetisch sind die SSI-ähnlichen Proteine der *Streptoverticillium* Spezies in die der *Streptomyces* Proteine eingeschlossen, bilden aber eine monophyletische Gruppe als distinkte Abstammungslinie innerhalb der *Streptomyces* Proteine. Dies bietet einen alternativen phylogenetischen Rahmen als der vorherige, der auf den partiellen 16S rRNA Sequenzen basiert, und könnte darauf hinweisen, dass die phylogenetische Zugehörigkeit des Genus *Streptoverticillium* überarbeitet werden sollte (Taguchi *et al.* 1997). Hauptsächlich hemmen diese Inhibitoren Subtilisin, einige aber auch Trypsin und Chymotrypsin, die zu den Serinproteasen gehören (Taguchi *et al.* 1994). Es gibt aber auch doppelköpfige SSI-ähnliche Inhibitoren, die zusätzlich zu Serinproteasen auch Metalloproteasen hemmen (Hiraga *et al.* 2000), dazu gehört das SSI-ähnliche Polypeptid von *S. mobaraensis*, welches die TAMEP inhibiert (Zotzel *et al.* 2003a). Die TAMEP aktiviert die TGase durch Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Phe⁻⁴ und Ser⁵, wobei das Tetrapeptid Phe-Arg-Ala-Pro am N-Terminus der reifen TGase verbleibt (Abb. 2.5), das Enzym jedoch die volle katalytische Aktivität besitzt (Zotzel *et al.* 2003a).

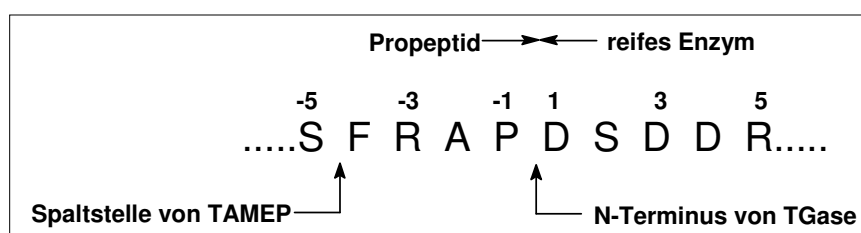


Abb. 2.5: Die Aminosäuresequenz an der Spaltstelle der bakteriellen TGase von *S. mobaraensis*. Die Spaltstelle der TAMEP, der N-Terminus der reifen TGase und die Peptidbindung zwischen dem Propeptid und dem reifen Enzym sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Im letzten Prozessierungsschritt wird das Tetrapeptid von einer Tripeptidyl-Aminopeptidase (TAP) ohne Bildung eines Intermediates entfernt (Abb. 2.6). Durch geringe Mengen an Ca^{2+} kann deren Aktivität stimuliert werden. Die hohe Spezifität der TAP für die FRAP-TGase deutet darauf hin, dass das Tetrapeptid die bereits aktivierte TGase regulieren könnte, indem es das Enzym in der Mureinschicht zurückhält. Das könnte durch ionische Interaktionen zwischen negativ geladenen Zellwandkomponenten und dem positiv geladenen Arginin des Tetrapeptid erfolgen (Zotzel et al. 2003b).

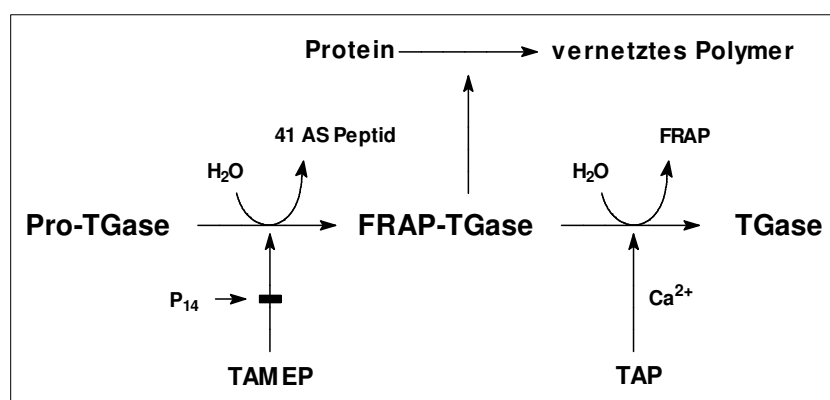


Abb. 2.6: Schema der TGase-Prozessierung. Die proTGase wird durch die TAMEP unter Freisetzung eines Peptids von 41 AS aktiviert. p14 kann die TAMEP durch Bindung im äquimolaren Verhältnis inhibieren. Die FRAP-TGase besitzt volle enzymatische Aktivität. In einem letzten Prozessierungsschritt durch die TAP wird das Tetrapeptid entfernt. Diese letzte Reaktion wird durch Ca^{2+} begünstigt.

2.2.3 Charakteristika und Katalysemechanismus der bakteriellen Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis*

TGasen katalysieren eine Acyltransfer-Reaktion, bei der die γ -Carboxyamid-Gruppe eines peptid- oder proteingebundenen Glutaminrestes als Acyldonor fungiert. Die häufigsten Acylakzeptoren der TGase sind die ϵ -Aminogruppen von Lysinresten in Peptiden oder die primären Aminogruppen einiger natürlich vorkommender Polyamine (Folk & Finlayson 1977, Lorand & Conrad 1984, Folk & Chung 1985, Aeschlimann & Paulsson 1994). Dienen die Lysinreste in Proteinen als Acylakzeptoren, werden inter- oder intramolekulare ϵ -(γ -Glutamyl)lysin-Isopeptidbindungen gebildet, die zu einer Polymerisation der Proteine führen. Abb. 2.7 zeigt die durch die TGase katalysiert Bildung einer Isopeptidbindung. Die γ -Carboxyamid-Gruppe von proteingebundenem Glutamin wird unter Freisetzung von Ammoniak auf ein primäres Amin übertragen.

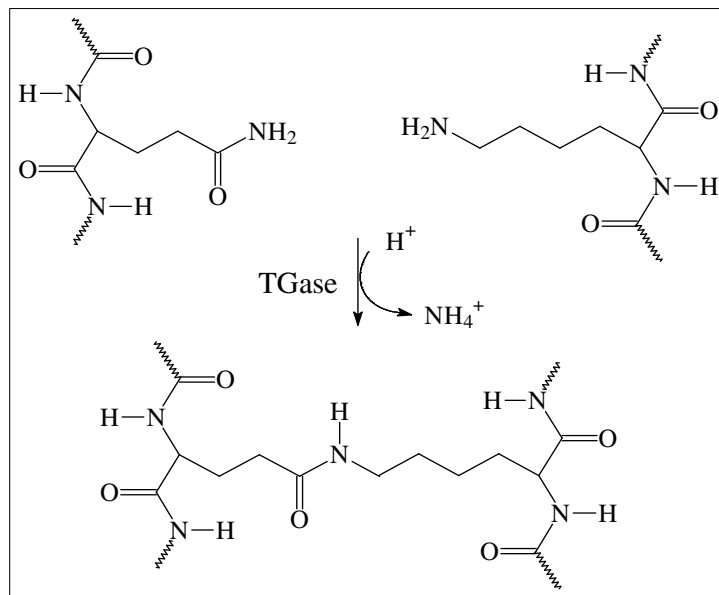


Abb. 2.7: Bildung einer Isopeptidbindung durch TGase-katalysierte Verknüpfung der Seitenketten von Glutamin und Lysin.

Die von Ando *et al.* 1989 isolierte TGase des Stamms S-8112 wurde als Monomer beschrieben, hat einen isoelektrischen Punkt von 8,9, der signifikant von dem des DSMZ-Stamm 40847 mit 8,0 abweicht (Pasternack 1998), ein pH-Optimum von 6 – 7 und ein Temperaturoptimum von 50°C. Das Enzym war die erste TGase, welche keinen Säugerursprung hat. Die Sequenzanalyse mittels Edman-Abbau zeigte, dass das Protein aus 331 Aminosäuren besteht und eine Molmasse von 37,9 kDa besitzt, was ungefähr mit der katalytischen Domäne von Faktor XIII-artigen TGasen übereinstimmt (Kanaji *et al.* 1993). Und auch sonst beschränkt sich die Gemeinsamkeit mit anderen Transglutaminasen auf die im Aktivzentrum befindlichen essentiellen Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat (Kanaji *et al.* 1993, Kashiwagi *et al.* 2002) und die Fähigkeit, Proteine unter Bildung einer ϵ -(γ -Glutamyl)lysin-Isopeptidbindung zu vernetzen (Sakamoto *et al.* 1994). Im Gegensatz zu vielen anderen TGasen ist die Aktivität der bakteriellen TGase Ca^{2+} -unabhängig (Ando *et al.* 1989). Auch bei der Untersuchung der Aminosäuresequenz konnten keine Homologien zu Calcium-Bindedomänen anderer TGase gefunden werden (Kanaji *et al.* 1993). Der Katalysemechanismus ist aber bei all diesen Enzymen sehr ähnlich. Das bakterielle TGase-Molekül ist scheibenförmig mit einer tiefen Spalte konstruiert, in der das für die katalytische Aktivität wichtige Cys^{64} sitzt. (Kashiwagi *et al.* 2002). Tierische TGase besitzen in ihrem Aktivzentrum die Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat (alternativ auch Asparagin), die eine sogenannte katalytische Triade bilden. Die Reaktion der TGase entspricht im Wesentlichen der Umkehr einer Proteolyse, die durch Cysteinproteasen mit einer ähnlichen katalytischen

Triade durchgeführt wird (Pedersen *et al.* 1994). Auch strukturell sind TGasen mit Papain-artigen Thiolproteasen verwandt, weswegen die beiden Enzymfamilien in dieselbe Superfamilie eingeteilt werden (Hubbard *et al.* 1999). Kashiwagi *et al.* verglichen 2002 die Struktur der TGase von *S. mobaraensis* mit der der Seebrassenleber-TGase (FTG). Die Anordnungen der Sekundärstrukturen um das Aktivzentrum dieser beiden Enzyme sind sehr ähnlich. Im Aktivzentrum der TGase von *S. mobaraensis* hingegen gibt es keine Cysteinprotease-artige katalytische Triade, wie sie bei Faktor XIII-artigen TGase auftritt, sondern die Positionen der katalytisch wichtigen Reste His²⁷⁴ und Asp²⁵⁵ sind relativ zum Cys⁶⁴ umgedreht angeordnet. Die Ähnlichkeit der Strukturen des Aktivzentrums und die Unterschiede in den Gesamtstrukturen zwischen bakterieller TGase und Faktor XIII-artigen TGasen könnten eine konvergente molekulare Evolution dieser Enzyme bedeuten. Im katalytischen Mechanismus der bakteriellen TGase übernimmt Asp²⁵⁵ wahrscheinlich die Aufgabe des His-Restes der Faktor XIII-artigen TGasen. Der hypothetische katalytische Mechanismus der TGase von *S. mobaraensis* ist in Abb. 2.8 dargestellt.

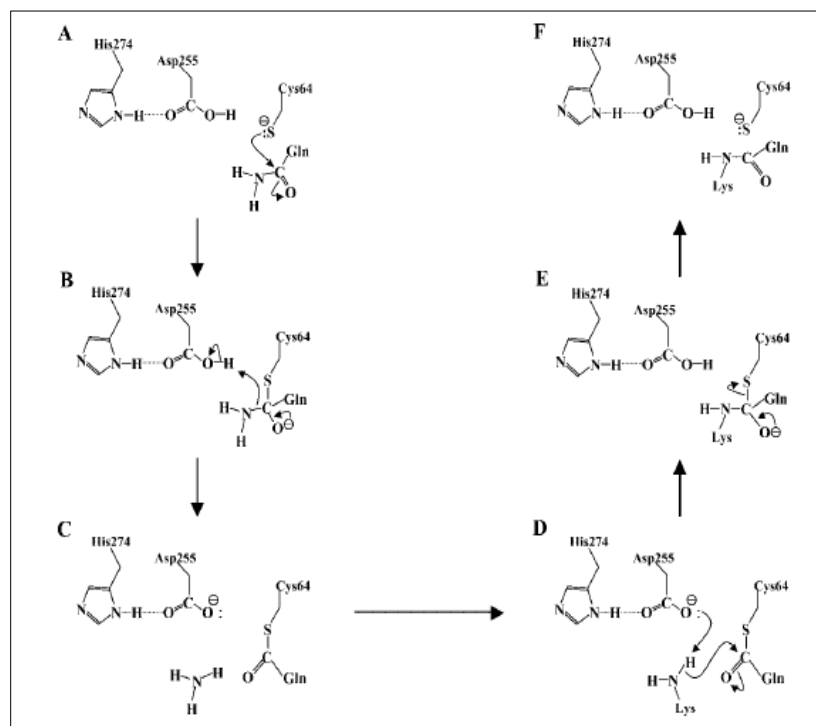


Abb. 2.8: Hypothetischer katalytischer Mechanismus der TGase von *S. mobaraensis* nach Kashiwagi *et al.* 2002.

In Schritt A greift das Thiolation des Cys⁶⁴ einen Acyldonor, die Seitenkette eines Gln-Restes, nucleophil an. In den Schritten B und C gibt Asp²⁵⁵ ein Proton an den Amidstickstoff des resultierenden Oxyanion- oder Acyl-Enzym-Intermediats ab, und Ammoniak wird freigesetzt. Die nachfolgende, in Abb. 2.8 nicht dargestellte

Protonenaufnahme von Ammoniak aus Wasser unter Bildung von Ammoniumionen verhindert die Umkehrung der katalytischen Reaktion. In Schritt D bindet ein Acylakzeptor, hier die Seitenkette eines proteingebundenen Lysinrestes, im Aktivzentrum und greift nucleophil den Thioester des Acyl-Enzym-Komplexes an. Das basische Asp²⁵⁵ unterstützt durch Übernahme des frei werdenden Protons. In den Schritten E und F wird das Thiolat von Cys⁶⁴ aus dem zweiten Oxyanion verdrängt, und das vernetzte Produkt wird freigegeben. Asp²⁵⁵ scheint essentiell für die katalytische Reaktion zu sein, da ein Austausch durch Alanin eine drastische Abnahme der Aktivität zur Folge hat (Shimba *et al.* unveröffentlicht). Andererseits scheint die Rolle des His²⁷⁴ in der katalytischen Reaktion nicht so wichtig zu sein. Deshalb könnte die TGase für ihre Katalyse auch nur eine katalytische Diade aus Cys und Asp nutzen, bei der His²⁷⁴ nur die Funktion hat, Asp²⁵⁵ zu positionieren und die Konformation des Aktivzentrums zu stabilisieren (Kashiwagi *et al.* 2002).

Ein weiterer Unterschied der bakteriellen TGase zu Faktor XIII-artigen TGasen ist eine umfassendere Substratspezifität für den Acyldonor und eine höhere Reaktionsrate (Shimba *et al.* 2002). Gründe dafür könnten zum einen sein, dass Cys⁶⁴ ausreichend zum Lösungsmittel exponiert ist und somit sofort mit dem Substrat reagieren kann. Zum anderen könnte die Flexibilität der rechten Wandung der Spalte des Aktivzentrums die sterische Behinderung zwischen Enzym und Substrat senken (Kashiwagi *et al.* 2002). Untersuchungen zur Substratspezifität der TGase von *S. mobaraensis* für Acyldonoren zeigte, dass synthetische Peptide mit einem Glycin oder einem positiv geladenem Rest N-seitig von Glutamin schlechte Substrate und Peptide mit einem Gly an der Carboxylseite gute Substrate sind (Ohtsuka *et al.* 2000). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Glutamindonoren mit der N-terminalen Seite an den vorderen Eingang der Spalte des Aktivzentrums binden und kleine Seitenketten vom Glutamin aus in Richtung C-Terminus benötigen, die eine große konformative Flexibilität gewährleisten und sterische Behinderungen mit dem Enzym vermeiden (Kashiwagi *et al.* 2002). Auch die Deamidierungsaktivität der bakteriellen TGase ist schwächer als die der FTG (Ohtsuka *et al.* 2001). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits 1997 von Pasternack *et al.* mit dem fluoreszierenden TGase-Substrat CBZ-Gln-Gly-CDNS gemacht. Dies könnte daran liegen, dass das negativ geladene Asp²⁵⁵ die Substratspezifität des Acylakzeptors dahingehend beeinflusst, dass es positiv geladene Aminogruppen elektrostatisch anzieht und damit den zweiten Substratbindeplatz für neutrale Spezies wie Wassermoleküle versperrt (Kashiwagi *et al.* 2002).

2.3 Substrate der bakteriellen Transglutaminase

2.3.1 Nachweismethoden für Transglutaminase-Substrate

Einfache Nachweismethoden, ob ein Protein ein TGase-Substrat ist, sind zum einen Versuche zur Homopolymerisation, bei der das gereinigte Protein allein mit der TGase inkubiert und anschließend die Quervernetzung mittels SDS-PAGE überprüft wird. Zum anderen kann eine Heteropolymerisation durchgeführt werden, bei der eine zweite Proteinspezies zum Einsatz kommt. Dabei handelt es sich meist um das Modellprotein Casein, welches sowohl ein sehr gutes Lysin- als auch Glutamin-Substrat für alle TGasen ist, oder N,N'-Dimethylcasein, welches nur ein Glutamin-Substrat ist, da die Lysinseitenketten durch Methylierung blockiert sind. Die Methylierung verhindert die intra- und intermolekulare Reaktion zwischen Glutamin- und Lysinresten von Casein und begünstigt die Bindung mit den primären Aminogruppen anderer Proteine oder Polyamine. Der Nachweis einer Quervernetzung erfolgt in diesem Fall durch einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einbau markierter Amino in die Seitenketten von zugänglichen Glutaminresten. Dafür gibt es drei Methoden, die sich in der Verwendung der markierten Aminosubstrate unterscheiden. Die erste basiert auf dem Einbau eines radioaktiv markierten Polyamins, z. B. ^{14}C -Cadaverin, ^{14}C -Ethanolamin, ^{14}C -Putrescin oder $[1,4(n)-^3\text{H}]$ Putrescin, in das potentielle Substrat (Sarkar *et al.* 1957). Die zweite basiert auf dem Einbau eines fluoreszierenden Polyamins (Lorand *et al.* 1966), z. B. 5-N-(5'-N',N'-dimethylaminonaphthalinsulfonyl)amidopentylamin (Monodansylcadaverin), welches durch Anregung mit UV-Licht bei 365 nm visualisiert werden kann. Und die dritte basiert auf dem Einbau eines biotinylierten Polyamins (Slaughter *et al.* 1992), z. B. 5-N-Biotinylamidopentylamin (Monobiotinylcadaverin), welches colorimetrisch mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat detektiert werden kann. In Abb. 2.9 ist letztere Methode des Nachweises reaktiver Glutaminseitenketten dargestellt.

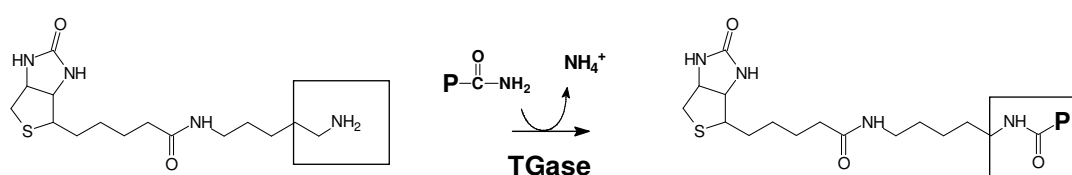


Abb. 2.9: Schema des Einbaus eines markierten Polyamins in reaktive Glutaminseitenketten von Substratproteinen durch TGase. Verwendung von Monobiotinylcadaverin unter Erzeugung eines biotinylierten Proteins (P), welches nach SDS-PAGE und Western Blot durch Reaktion mit einem Konjugat aus alkalischer Phosphatase und Streptavidin enzymatisch gefärbt wird.

Eine weitere Möglichkeit des Substratnachweises ist der Einbau eines fluoreszierenden Dipeptids in reaktive Lysinseitenketten, um Glutaminakzeptorproteine zu identifizieren (Pasternack et al. 1997). Dicyclohexylcarbodiimid-induzierte Kopplung des TGase-Substrats Carbobenzoxy-L-glutaminylglycin (CBZ-Gln-Gly) mit Monodansylcadaverin (CDNS, MDC) ergab CBZ-Gln-Gly-CDNS (1-N-(carbobenzoxy-L-glutaminylglycyl)-5-N-(5'-N',N'-dimethylaminonaphthalinsulfonyl)diamidopentan). Es fluoresziert wie Monodansylcadaverin bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm. Alternativ kann auch ein biotinyliertes Dipeptid (1-N-Biotinyl-6-N-(carbobenzoxy-L-glutaminylglycyl) diamidohexan, CBZ-Gln-Gly-DAH-Biotin) eingebaut und colorimetrisch wie Monobiotinylcadaverin detektiert werden. In Abb. 2.10 ist letztere Methode zum Nachweis von Seitenketten zugänglicher Lysine veranschaulicht.

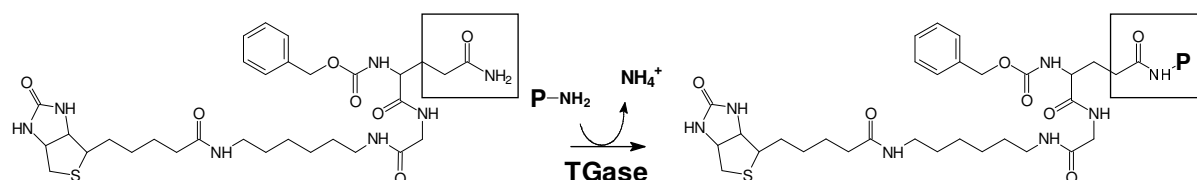


Abb. 2.10: Schema des Einbaus eines markierten Dipeptids in reaktive Lysinseitenketten von Substratproteinen durch TGase. Verwendung von CBZ-Gln-Gly-DAH-Biotin unter Erzeugung eines biotinylierten Proteins (P), welches nach SDS-PAGE und Western Blot durch Reaktion mit einem Konjugat aus alkalischer Phosphatase und Streptavidin enzymatisch gefärbt wird.

2.3.2 Substrate und Anwendung der Transglutaminase von Streptomyceten

Bisher konnten noch keine physiologischen Substrate der TGase von *S. mobaraensis* oder anderer Streptomyceten identifiziert werden. Deshalb können auch kaum Aussagen über die physiologische Rolle, Struktur-Funktions-Beziehungen und Substratspezifität des Enzyms gemacht werden. 2000 untersuchten Taguchi et al. die Substratspezifität der TGase von *S. mobaraensis* unter Verwendung proteinogener Proteaseinhibitoren von Streptomyceten als natürliche Modelsubstrate. Als Homologe (Taguchi et al. 1992, Taguchi et al. 1993a, b) des *Streptomyces* Subtilisin Inhibitors SSI (Hiromi et al. 1985) werden sie auch als SIL-Proteine (Subtilisin inhibitor like proteins) bezeichnet (Taguchi et al. 1997). Die Inhibitorspezifität von SIL-Proteinen für eine Protease korreliert eng mit den strukturellen Eigenschaften an der jeweiligen Bindungsstelle und belegt zusätzlich ihre Verwandtschaft (Taguchi et al. 1994, Kojima et al. 1994, Terabe et al. 1994, 1996). Deshalb wurden offensichtlich auch wichtige Einblicke in die molekulare Erkennung von Bindungsmotiven durch die TGase erwartet. Außerdem weist ein ähnliches chromatographisches Verhalten des SIL-Proteins von *S. mobaraensis* bei der Reinigung

von TGase darauf hin, dass eine Affinität zwischen Enzym und Proteaseinhibitor existieren könnte (Gerber *et al.* 1994). Bei keinem der von Taguchi *et al.* 2000 getesteten SIL Proteinen konnte eine Homopolymerisation festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass entweder eine reaktive Glutamin- oder Lysinbindestelle fehlt. Wurde β -Casein als Reaktionspartner verwendet, zeigte sich, dass das SIL Protein von *S. mobaraensis* JCM4168 (SIL-V6) ein schwaches Substrat von TGase ist. Unter reduzierenden Bedingungen, mit 10 mM DTT im Ansatz, konnte dieser Effekt verstärkt werden.¹ Das beste Substrat aber war unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen der Inhibitor STI2 von *S. longisporus*, welcher nicht als TGase-Produzent beschrieben ist.

Nicht-physiologische Substrate der TGase von *S. mobaraensis* sind hingegen viele bekannt, da das Enzym einen weitreichenden Einsatz bei der Vernetzung von Proteinen in der Lebensmittelindustrie findet. In diesem Bereich werden allerdings hauptsächlich hitzedenaturierte oder mit DTT oder β -Mercaptoethanol reduzierte Proteine eingesetzt, weil dadurch die Substrateigenschaften gegenüber der TGase verbessert werden können. Einige Beispiele dafür sind bovines und humanes Serumalbumin, sowie Conalbumin (Nonaka *et al.* 1989), Ovomucin (Kato *et al.* 1991), Actin (Huang *et al.* 1992), Monellin (Ota *et al.* 1999) und Gliadin (Skovbjerg *et al.* 2002). Tab. 2.2 soll einen Überblick über native, nicht-physiologische Substrate der TGase geben, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil der Proteine in denaturierter Form verwendet wurde. Die Denaturierung kann bereits bei der Isolierung eintreten und ist bei Proteinen ohne Aktivität nicht ohne größeren Aufwand nachweisbar.

Tab. 2.2: Native, nicht-physiologische Substrate der TGase von *S. mobaraensis*.

Proteine	Herkunft	Referenz
α_{S1} -Casein 7S-, 11S-Globulin Myosin	Rind (Milch) Sojabohne Kaninchen	Nonaka <i>et al.</i> 1989
Glycinin	Sojabohne	Kang <i>et al.</i> 1994
Interleukin-2	Mensch (rekombinant)	Sato <i>et al.</i> 2001
α -Lactalbumin	Rind (Molke)	Sharma <i>et al.</i> 2001
Actin	Kaninchen	Huang <i>et al.</i> 1992
S-Peptid der Ribonuclease		Kamiya <i>et al.</i> 2003
Globulin	Hafer	Siu <i>et al.</i> 2002
Ara h 1	Erdnuss	Clare <i>et al.</i> 2007

¹ Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, dass die Primärstruktur von SIL-V6 nicht identisch mit der Sequenz des TAMEP-Inhibitors (DSMZ-Stamm 40847) sein könnte, da z. B. im Gegensatz zu diesem bei *S. mobaraensis* S-8112 alle drei Glutaminreste im N-terminalen Peptid fehlen (K. Yokoyama, persönliche Mitteilung).

In der Lebensmittelindustrie wird die TGase hauptsächlich zur Vernetzung von Proteingemischen eingesetzt, z. B. Fleisch (Sakamoto & Soeda 1991, Seguro & Motoki 1991), Fisch (Wakameda *et al.* 1990), Weizen- und Sojamehl (Ashikawa *et al.* 1990, Nonaka *et al.* 1990), Collagen (Tani *et al.* 1990), Gelatine (Yamanaka & Sakai 1992), Casein (Noguchi *et al.* 1992) oder Pflanzenproteine (Soeda *et al.* 1992). Dabei spielt die Ca^{2+} -Unabhängigkeit der TGase eine bedeutende Rolle, da Proteine wie beispielsweise Casein oder Sojaglobuline sehr sensitiv auf das Vorhandensein von Ca^{2+} reagieren bzw. sogar ausfallen (Yokoyama *et al.* 2004). Transglutaminase ermöglicht die Verknüpfung von kleinen Fleischstücken oder Hackfleisch zu Steaks sowie Fleischbällchen, wodurch die Produktausbeute durch Verwendung von Restfleischbestand erheblich gesteigert werden kann (Zhu *et al.* 1995). Diese Anwendungen sind auch für Fischfleisch möglich. Milchprodukte können durch den Einsatz von TGase ebenfalls verbessert werden. So kann beispielsweise das Wasserbindevermögen von Joghurt durch TGase-vermittelte Caseinverknüpfung erhöht und eine Wasserabsonderung auf der Joghurt-Oberfläche vermieden werden (Yokoyama *et al.* 2004). Auch zur Konservierung von Gemüse oder Obst kann ein Gemisch aus Proteinen, Gelatine, natürlichen Bakterioziden und Transglutaminase eingesetzt werden, welches nach Erhitzen auf die Früchte gegeben wird (Zhu *et al.* 1995). Dies verringert das bakterielle Wachstum und verlängert die Haltbarkeit. Weiterhin kann die Textur von Tofu sowie Nudeln verbessert werden (Yokoyama *et al.* 2004). Auch in anderen Bereichen wie beispielsweise der Medizin, Analytik und Kosmetikindustrie ist die Verwendung von Transglutaminase möglich.

2.4 Zielsetzungen der Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Suche nach den ersten physiologischen TGase-Substraten von *S. mobaraensis*. Nur Taguchi *et al.* (2000) zeigten bei einer breiten Durchmusterung von SIL-Proteinen, dass möglicherweise der proteinogene Enzyminhibitor SIL-V6 von *S. mobaraensis* ein Substrat von TGase sein könnte. Unklar blieb in dieser Arbeit, ob es sich dabei um ein Glutamin- oder ein Lysindonorprotein handelt. Jedenfalls sollten SIL-Proteine, diesem Bericht zufolge, nicht über beide Reaktivzentren verfügen, weil eine enzymatische Homopolymerisation ausblieb. Hinzu kommt, dass offensichtlich unterschiedliche *S. mobaraensis*-Stämme nicht die gleichen SIL-Proteine produzieren. Das Protein von *S. mobaraensis* S-8112 zeigt am N-Terminus beträchtliche Sequenzunterschiede zu dem von Zotzel *et al.* (2003) isolierten SIL Protein (Nio & Yokoyama, persönliche Mitteilung). Substratproteine müssen aus diesem Grund

bei dem Stamm gesucht werden, der Transglutaminase produziert. Insgesamt gaben die Ergebnisse von Taguchi *et al.* (2000) keinen Anlass, bereits zu Beginn der Arbeit mit einem SIL-Protein als potentielltem Substrat von TGase zu arbeiten. Außerdem konnte bei früheren Arbeiten das SIL-Protein des DSMZ-Stamms 40847 nicht durch TGase markiert werden (Fuchsbauer, persönliche Mitteilung).

Mit der Annahme, dass während der Kultivierung vorzugsweise die Vernetzung der Substratproteine stattfindet, sollte die Anzucht von *S. mobaraensis* mit einem geeigneten Inhibitor der Quervernetzung durchgeführt werden. Da Transglutaminasen einen wesentlichen Anteil am Aufbau einer kovalent vernetzten und verhornten Proteinschicht der menschlichen Haut haben (Candi *et al.* 1995), die wie der äußere Proteinmantel von Lufthyphen eine Barrierefunktion hat, erscheint eine ähnliche Funktion von TGase bei der Lufthyphenbildung nahe liegend. In Flüssigkultur bildet *S. mobaraensis* bestenfalls Lufthyphenfragmente, sodass mögliche Substratproteine ähnlich wie Transglutaminase in größeren Mengen sezerniert werden sollten und dann in Gegenwart des TGase-Inhibitors unvernetzt isoliert werden können.

Ein weiteres Vorhaben dieser Arbeit war die proteinchemische und enzymatische Charakterisierung der identifizierten Substratproteine. Die Untersuchungen sollten dazu beitragen, die Funktion der Proteine, aber auch der Transglutaminase besser zu verstehen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mikroorganismen

Der Stamm *Streptomyces mobaraensis* (DSM Nr. 40847) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, bezogen.

3.1.2 Feinchemikalien und Lösungsmittel

Alle Feinchemikalien und Lösungsmittel entsprachen, falls nicht gesondert angegeben, der Qualität *pro analysis*.

Acrylamid, 4K-Lösung (30%), Mix 29:1	AppliChem, Darmstadt
Agar-Agar	Otto Nordwald, Hamburg
ϵ -Aminocapronsäure	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
BCIP	AppliChem, Darmstadt
N-Biotinylcadaverin	N-Zyme BioTec, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cadaverin	Fluka, Neu-Ulm
Calciumcarbonat, gepulvert	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
CBZ-Gln-Gly-Dansylcadaverin	N-Zyme BioTec, Darmstadt
CBZ-Gln-Gly-Diaminohexan-Biotin	N-Zyme BioTec, Darmstadt
CBZ-Gln-Gly-OH	N-Zyme BioTec, Darmstadt
CHAPS	AppliChem, Darmstadt
Citronensäure x 1 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma, Taufkirchen
N-(3-Dimethylamino)propyllauramid (97%)	Aldrich, Milwaukee, USA
DMF	Merck, Darmstadt
DMSO	AppliChem, Darmstadt
Dodecyl- β -D-maltosid	AppliChem, Darmstadt
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA-Salz	Merck, Darmstadt
Eisen(III)-chlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Eisen(III)-citrat x 1 H ₂ O	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure, 99 – 100%	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol, 99%, vergällt mit 1% MEK	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt

D-(+)-Glucose x 1 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt
Glutaraldehyd	Baker, Deventer, Holland
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanidiniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt, granuliert	Merck, Darmstadt
HEPES	AppliChem, Darmstadt
Hydroxylammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kobalt(II)-chlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat x 5 H ₂ O	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Malzextrakt	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-sulfat x 1 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol, protein sequencing grade	AppliChem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	EGA-Chemie, Steinheim/Albuch
Monodansylcadaverin	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Fluka, Neu-Ulm
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
tri-Natriumcitrat x 2 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat x 2 H ₂ O	Fluka, Neu-Ulm
di-Natriumtetraborat x 10 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NBT	AppliChem, Darmstadt
n-Octyl-β-D-glucopyranosid	AppliChem, Darmstadt
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	AppliChem, Darmstadt
1,10-Phenanthrolin	Roth, Karlsruhe
PMSF	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37%)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	AppliChem, Darmstadt
Siliconöl	Fluka, Neu-Ulm
Stärke, löslich	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Taufkirchen
D-(+)-Trehalose x 2 H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma, Taufkirchen

Tween 20
 Tween 80
 Zinkchlorid

Sigma, Taufkirchen
 Merck, Darmstadt
 Fluka, Neu-Ulm

3.1.3 Verbrauchsmaterialien und Kits

BCA Proteinbestimmungs-Kit
 Blottingfilter
 Deckgläschen für die Mikroskopie
 Dialyseschläuche (MWCO 12000 – 14000)
 (MWCO 6000 – 8000)
 Faltenfilter
 Glasperlen für die Mikrobiologie, d = 0,5 mm
 IEF-Anodenflüssigkeit 3
 IEF-Applikatorstreifen
 IEF-Elektrodendochte
 IEF-Gele, Blank PRECOTES
 IEF-Gele, SERVALYT PRECOTES 3 – 10
 IEF-Kathodenflüssigkeit 10
 IEF-SERVALYT 7 – 9, 9 – 11
 Immersionsöl für die Mikroskopie
 Kalibrierungskit für die GPC
 Kanülen
 Küvetten, Acryl, Fluoreszenz
 Küvetten, UV
 Marker-Proteinmischung 3 – 10 für die IEF
 Mikrotiterplatten, Polystyrol
 Nescofilm
 Nitrocellulosemembran Protran BA 85 0,45 µm
 Objektträger für die Mikroskopie
 Petrischalen Ø 84 mm
 pH-Indikatorpapier
 pH-Indikatorstäbchen
 Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl
 Pipettenspitzen 5000 µl
 Prestained SDS PAGE ProteinMarker
 PVDF-Membranen 0,2 µm
 Reagenzröhre 15 ml
 Reaktionsgefäße 0,65 ml
 Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml
 Röhrchen 50 ml
 Rundfilter

 SDS-Proteinmarker für Kapillarelektrophorese
 Spritzen
 Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm
 Watte

Interchim, Montluçon, Frankreich
 Whatman, Dassel
 Marienfeld, Lauda-Königshofen
 Serva, Heidelberg
 Roth, Karlsruhe
 Schleicher & Schuell, Dassel
 IMA GmbH, Zeppelinheim
 Serva, Heidelberg
 Serva, Heidelberg
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Serva, Heidelberg
 Serva, Heidelberg
 Serva, Heidelberg
 Serva, Heidelberg
 Merck, Darmstadt
 Sigma, Taufkirchen
 B. Braun, Melsungen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Brand, Wertheim
 Serva, Heidelberg
 Nunc, Dänemark
 Azwell, Osaka, Japan
 Whatman, Dassel
 Marienfeld, Lauda-Königshofen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Sarstedt, Nümbrecht
 VWR, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 BioRad, München
 Sarstedt, Nümbrecht
 Roth, Karlsruhe
 Sarstedt, Nümbrecht
 Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Schleicher & Schuell, Dassel
 Macherey-Nagel, Düren
 Sigma, Taufkirchen
 B. Braun, Melsungen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Rauscher, Wien, Österreich

3.1.4 Enzyme, Peptide und Proteine

Aldolase (Bäckerhefe)	Sigma, Taufkirchen
alkalische Phosphatase (Rindermagenschleimhaut)	Sigma, Taufkirchen
Bromelain (<i>Ananas comosus</i>)	Sigma, Taufkirchen
BSA	Serva, Heidelberg
Bz-Arg-pNA x 1 HCl	Bachem, Heidelberg
Carboxypeptidase A (Schweinepankreas)	Sigma, Taufkirchen
Carboxypeptidase B (Schweinepankreas)	Merck, Darmstadt
α_{s1} -Casein	Sigma, Taufkirchen
Casein, alkalilöslich	Merck, Darmstadt
α -Chymotrypsin (Rinderpankreas)	Sigma, Taufkirchen
Collagenase (<i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma, Taufkirchen
γ -Crystallin (Rinderaugenlinse)	Sigma, Taufkirchen
Dabcyl-Ser-Phe-EDANS	AG Fuchsbauer, Darmstadt
Dispase I (<i>Bacillus polymyxa</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim
Lectin (pflanzlich)	Zedira, Darmstadt
Lysozym (Huhn)	Merck, Darmstadt
Meerrettich-Peroxidase	Sigma, Taufkirchen
Ovalbumin (Huhn)	Sigma, Taufkirchen
Ovotransferrin (Huhn)	Sigma, Taufkirchen
Papain (<i>Carica papaya</i>)	Merck, Darmstadt
Protarmor (Molke)	N-Zyme, Darmstadt
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	Merck, Darmstadt
Subtilisin A (<i>Bacillus licheniformis</i>)	Sigma, Taufkirchen
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Bachem, Heidelberg
TAMEP (<i>Streptomyces mobaraensis</i>)	AG Fuchsbauer, Darmstadt
Thermolysin (<i>Bacillus thermoproteolyticus rokko</i>)	Sigma, Taufkirchen
Transglutaminase (<i>Streptomyces mobaraensis</i>)	AG Fuchsbauer, Darmstadt
Trypsin (Rinderpankreas)	Sigma, Taufkirchen
Trypsin, proteomics grade (Schweinepankreas)	Sigma, Taufkirchen

3.1.5 Materialien für chromatographische Verfahren

CM-Sepharose	Sigma, Taufkirchen
DEAE-Affi-Gel Blue Fertigsäulen	BioRad, München
DEAE-Sepharose	Sigma, Taufkirchen
Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Sephadex G-25 F	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Entsalzungssäulen Econo-Pac 10DG	BioRad, München
Entsalzungssäulen PD-10	GE Healthcare, München
Fractogel EMD SO_3^-	Merck, Darmstadt
Fractogel EMD TMAE	Merck, Darmstadt
HiLoad 16/60; Superdex 75 prep grade	Pharmacia, Uppsala, Schweden
HiLoad 16/60; Superdex 200 prep grade	Pharmacia, Uppsala, Schweden

3.1.6 Antikörper und Seren

Kaninchenserum gegen fluoreszierendes Polymer	Eurogentec, Seraing, Belgien
Kaninchenserum gegen proTGase von <i>S. mobaraensis</i>	Eurogentec, Seraing, Belgien

Kaninchenserum gegen TAMEP
 Kaninchenserum gegen DAIP
 Kaninchenserum gegen SSTI
 Ziegen IgG, Anti-(Kaninchen IgG)-
 Konjugat mit alkalischer Phosphatase

Eurogentec, Seraing, Belgien
 BioGenes, Berlin
 BioGenes, Berlin
 Sigma, Taufkirchen

3.2 Geräte

3.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen

Vertikaler Autoklav 3870 ELV
 Brutschrank 80 UL
 Kultivierungskolben 1000 ml, Erlenmeyer-Schikane
 Magnetrührer KMO 2 basic
 IKAMAG® RH
 Combimag RCT
 Mikroskop
 pH-Elektrode
 pH-Meter
 pH 526 Multical
 Schüttler Certomat MO II
 Swip KS 10
 Sterilbank Hera Safe
 Vortex VF2
 Zentrifugen Biofuge A
 Sigma 1-15K
 Sigma 3K30C
 Sigma 6K15
 Zentrifugenbecher

Tuttnauer, Breda, Niederlande
 Memmert, Schwalbach
 Schott, Mainz
 IKA-Werke, Staufen
 IKA-Werke, Staufen
 IKA-Werke, Staufen
 Olympus, Hamburg
 Schott, Mainz
 Schott, Mainz
 WTW, Weilheim
 Sartorius, Göttingen
 Edmund Bühler GmbH, Tübingen
 Kendro, Hanau
 IKA-Werke, Staufen
 Heraeus Christ, Osterode
 Sigma, Osterode
 Sigma, Osterode
 Sigma, Osterode
 Nalgene, New York, USA

3.2.2 Chromatographische Verfahren

Chromatographieschrank, TC603-1
 Einkanal-Monitor UV-1-Kontrolleinheit
 Einkanal-Monitor UV-1-Optische Einheit
 Fraktionssammler Frac 100
 Peristaltikpumpe P-1
 Schreiber LKB Rec1
 FPLC-Anlage: Fraktionssammler, L5200
 Schreiber
 Ternäre Pumpe, L7120
 UV-Detektor, L4200

Tritec, Hannover
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Merck-Hitachi, Darmstadt
 Knauer, Berlin
 Merck-Hitachi, Darmstadt
 Merck-Hitachi, Darmstadt

3.2.3 Konzentrierung von Proteinlösungen

Lyophilisator, ALPHA 1-4 LCS
 Vakuumpumpe
 Zentrifugationskonzentratoren, Microsep 10K

Heraeus Christ, Osterode
 Vacuubrand, Wertheim
 Pall Filtron, Dreieich

3.2.4 Bestimmung von Proteinkonzentration und Enzymaktivität

Blockthermostat BT2000	Kleinfeld, Gehrden
Mikrotiterplattenreader	
Steuereinheit Digiscan 340	Asys Hitech GmbH, Österreich
Software, Mikrowin 2000	Mikrotek, Overath
Genios	Tecan, Crailsheim
Software, Magellan 2.0	Tecan, Crailsheim
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
UV/Vis Spectrometer Lambda 2	Perkin Elmer, Überlingen
UV/Vis Spektrophotometer Ultrospec 1100 pro	Amersham Biosciences, USA

3.2.5 Elektrophoretische und immunchemische Verfahren

Geldokumentation	BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
	Software BioDoc Analyze 2.0	Biometra, Göttingen
	Digitalkamera	Canon, Krefeld
LKB 2117 Multiphor II Elektrophoreseeinheit		Pharmacia, Uppsala, Schweden
LKB 2197 Power Supply		Pharmacia, Uppsala, Schweden
Mini-Protean III		BioRad, München
Power Pac HC		BioRad, München
Power Supply EPS 600		Pharmacia, Uppsala, Schweden
Schüttler 3016		GLF, Burgwedel
Thermostat		MGW, Lauda
Trans-Blot Semi-Dry Transferzelle		BioRad, München
Wasserbad		Memmert, Schwalbach

3.3 Methoden zur Kultivierung

Alle mikrobiologischen Arbeiten erfolgten steril, um Kontaminationen der Kulturen oder die Freisetzung von bakteriellem Material zu vermeiden. Die zur Kultivierung verwendeten Medien, nicht steril verpackte Arbeitsmaterialien und Glasgefäße sowie alle Rückstände mikrobiellen Materials wurden in feuchter Hitze bei 121°C 20 min autoklaviert. Thermolabile Lösungen, wie z. B. die Spurenelementelösung, wurden sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter). Die verwendeten Medien wurden mit Umkehrosmose-Wasser (Qualität entsprechend A. dest.) angesetzt, alle Puffer, Lösungen und Verdünnungen mit Milli-Q-Wasser (Qualität entsprechend A. bidest.).

3.3.1 Nährmedien

- **GYM-(GlucoseYeastMalt)-Medium**

(Shirling & Gottlieb 1966)	4,0 g	Glucose
	4,0 g	Hefeextrakt
	10,0 g	Malzextrakt
	2,0 g	CaCO ₃
	15,0 g	Agar-Agar
ad 1 l A. dest.		

Nach vollständigem Lösen wurde der pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7,2 eingestellt.

- **Komplexmedium**

Stärke-Mineralsalz-Medium:

(Shirling & Gottlieb 1966)	10,0 g	Stärke
	2,0 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
	1,0 g	K ₂ HPO ₄
	1,0 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1,0 g	NaCl
	2,0 g	CaCO ₃
ad 1 l A. dest.		

Spurenelementlösung nach Voelskow zugegeben und mit einer Vorkultur, die auf GYM-Agarplatten angezogen wurde, oder 75 µl Sporensuspension ($4,2 \times 10^7$ Sporen/ml) beimpft. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 28°C. Der Sauerstoffeintrag, welcher für das Wachstum der aeroben Bakterien benötigt wird, erfolgte durch intensive Bewegung der Kulturen auf einem Schüttler bei 110 rpm. Nach 43 – 93 h Kultivierung wurde das Kulturmedium von den Mikroorganismen durch Vakuumfiltration über einen Büchnertrichter getrennt und anschließend direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.3.4 Herstellung von Sporensuspension

Um gleichmäßiges Wachstum von *S. mobaraensis* auf GYM-Platten zu gewährleisten und eine höhere Reproduzierbarkeit zu erzielen, wurde eine Sporensuspension hergestellt. Dazu wurde zu einer 3 Wochen alten, durchsporulierten Plattenkultur 20 ml steriles destilliertes Wasser, dem zur besseren Benetzung der hydrophoben Sporen 0,1 ml Tween 20 zugesetzt war, zugegeben. Anschließend wurden die Sporen mit einer ausgeglühten Impföse von der Oberfläche gekratzt. Eine Trennung von Luftmycel und Sporen wurde durch eine Filtration mit steriler Watte in einer 20 ml Spritze erreicht.

3.3.5 Ermittlung der Lebendkeimzahl einer Sporensuspension

Um die Lebendkeimzahl der Sporensuspension zu bestimmen, wurde diese dekadisch verdünnt und davon jeweils 100 µl mit einem Drigalski-Spatel auf GYM-Platten ausplattiert. Die sichtbaren Kolonien wurden nach einer Kultivierung von 3 und 7 Tagen bei 28°C ausgezählt. Zur Zählung wurden nur Agarplatten verwendet, bei denen die Zahl der Kolonien zwischen 10 und 400 lag. Damit wurde die Anzahl der keimfähigen Sporen (colony forming units, CFU) pro ml Ausgangssuspension berechnet.

3.3.6 Stammkonservierung

Zur Stammkonservierung wurden die Streptomyceten nach etwa 20 d mit einer ausgeglühten Impföse auf eine neue GYM-Platte ausgestrichen, anschließend mit Nescofilm verschlossen und bei 28°C inkubiert. Eine weitere Methode ist die Stammhaltung als Gefrierkonserve bei -80°C. Dazu wurden jeweils 700 µl

Sporensuspension in sterilen Eppendorf-Gefäßen mit 300 µl 50%igem Glycerin versetzt. Die Konserven wurden kurz gevortext und anschließend bei –80 °C gelagert.

3.4 Bestimmung der Enzymaktivität von Transglutaminase

3.4.1 Prinzip und Reagenzien

Proteinlösungen müssen nicht steril gehandhabt werden. Die verwendeten Puffer wurden bei 4 °C gelagert, um ihre Haltbarkeit zu erhöhen. Die proteinbiochemischen Arbeiten wurden in der Regel unter Eiskühlung durchgeführt, die Lagerung von Proteinlösungen erfolgte bei –20 °C.

Grundlage zur Bestimmung der Aktivität von bakteriellen Transglutaminasen bildet der enzymkatalysierte Einbau von Hydroxylamin in das synthetische Substrat Carbobenzoxyl-L-glutaminylglycin (CBZ-Gln-Gly-OH) unter definierten Bedingungen (Grossowicz *et al.* 1950). Es handelt sich hierbei um eine nicht-kontinuierliche Bestimmungsmethode, bei der die Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt mit einem Säuregemisch abgebrochen wird. Dabei wird gleichzeitig die an der Glutamyl-Seitenkette des Peptidderivats gebildete Hydroxamsäure mit Eisen(III)-Ionen komplexiert und photometrisch bei 525 nm quantifiziert.

Hydroxylaminlösung:	0,8 M	Hydroxylammoniumchlorid
	2,24% (w/v)	NaOH
		pH 6,4

Reagenz A:	0,1 M	Hydroxylamin
	0,2 M	Tris-Acetat
		pH 6,0

Reagenz A ist bei 4 °C vier Wochen lagerbar

Reagenz B:	30 mM	CBZ-Gln-Gly-OH
------------	-------	----------------

in Reagenz A

Reagenz C: entsprechend der Anzahl der zu analysierenden Proben wurden gleiche Volumina von:

12% (w/v) HCl

5% (w/v) FeCl₃ in 0,1 M HCl

12% (w/v) CCl₃COOH

gemischt.

3.4.2 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität in 1,5 ml Reaktionsgefäßen

Die Durchführung der Analyse erfolgte nach dem Pipettierschema von Tab. 3.1. Die Inkubationsmischung ohne Probe (Reagenz B) wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen 5 min bei 37 °C temperiert. Anschließend wurde die Enzymlösung zugegeben, und der Reaktionsansatz wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Pipette durchmischt.

Die Bestimmung der Transglutaminaseaktivität in Kulturmedien erforderte aufgrund der teilweise intensiven Eigenfärbung die zusätzliche Messung eines Probenblindwertes. Die Zugabe des stark sauren Reagenzes C vor der Probelösung inhibiert die enzymatische Reaktion, so dass ausschließlich die Absorption der Eigenfärbung bestimmt wird. Die Enzymaktivität berechnet sich entsprechend aus der Extinktionsdifferenz von Probe und Blindwert.

Tab. 3.1: Pipettierschema zur Bestimmung der TGase-Aktivität in 1,5 ml Mikroküvetten.

	Reagenzienblindwert	Probenblindwert	Probenwert
Inkubationsansatz	500 µl Reagenz B	500 µl Reagenz B 500 µl Reagenz C	500 µl Reagenz B
Temperieren	5 min bei 37 °C		
Reaktionsstart	50 µl Tris-Acetat	50 µl Probe	50 µl Probe
Inkubation	10 min bei 37 °C		
Termination	500 µl Reagenz C	-	500 µl Reagenz C
	kräftig schütteln		
Zentrifugation zum Abtrennen präzipitierter Proteine	5 min, 10000 rpm		
Bestimmung der Extinktion	unmittelbar im Anschluss bei 525 nm		

Die Enzymaktivität der Transglutaminasen ist definiert als:

$$1 \text{ U} = \frac{1 \text{ } \mu\text{mol gebildete Hydroxamsäure}}{\text{min}}$$

Die Volumenaktivität der Probenlösung berechnet sich aus der Konzentration der gebildeten Hydroxamsäure bzw. aus der gemessenen Extinktionsdifferenz.

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot t}$$

mit	ΔE	Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Blindwert
	V	Gesamtvolumen (1,05 ml)
	ϵ	Extinktionskoeffizient Eisen(III)-Glutamyhydroxamat (0,470 ml/ $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$)
	d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
	v	Probenvolumen (50 μl)
	t	Reaktionszeit (10 min)

Anhand der gegebenen Größen lässt sich die Volumenaktivität für Transglutaminase nach folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]_{525\text{nm}} = \Delta E \cdot 4,47 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

3.5 Konzentrierung, Entsalzen und Teilreinigung von Proteinlösungen

3.5.1 Ethanol-Fällung

Protisch, dipolare Lösungsmittel wie Ethanol setzen die Löslichkeit von Ionen (Salze, Proteine) im wässrigen Milieu aufgrund ihrer niedrigen Dielektrizitätskonstante herab. Die Ethanolfällung wurde vor der chromatographischen Reinigung der Proteine aus dem Flüssigkulturmedium, aber auch zur Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen verwendet. Um die Denaturierung der Proteine durch Ethanol zu verringern, wurde die Fällung in einem Eisbad durchgeführt. Unter ständigem Rühren wurde zu dem vorgekühlten Kulturmedium oder der Proteinlösung langsam Ethanol (-20°C) bis zu einer

maximalen Volumenkonzentration von 90 Prozent zugegeben. Der durch Zentrifugieren (10000 rpm, 15 min, 4°C) erhaltene Niederschlag wurde anschließend im gewünschten wässrigen Puffersystem aufgenommen.

3.5.2 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ermöglicht die Entfernung niedermolekularer Substanzen sowie die Konzentrierung von Proteinlösungen. Die Proben mit einem Volumen bis zu 3,5 ml wurden in Microsep 10K Röhrchen gegeben und bei 3000 – 7500 rpm bei 4°C durch die Membran mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa gedrückt. Durch alternierende Zugabe von Puffer und Zentrifugation wurde die Ausgangslösung umgepuffert, entsalzt und auf ein Volumen von bis zu 500 µl eingeeengt.

3.5.3 Lyophilisation

Die Lyophilisation (Gefriertrocknung) ermöglicht die schonende Konzentrierung von Proteinlösungen. Im Vakuum wird einer Proteinprobe Wasser durch Sublimation entzogen. Vor der Gefriertrocknung wurde die Probe bei –20°C eingefroren. Bei einer Eiskondensator-Temperatur von –55°C, 0,94 – 1,03 mbar und einer Stellflächen-Temperatur von 10°C wurden Proteinproben von 100 µl bis 100 ml bis zum gewünschten Volumen eingeeengt oder getrocknet.

3.5.4 Dialyse

Die Abtrennung von hydrophilen Verunreinigungen und Salzen erfolgte auch durch Dialyse. Hierzu wurden die Dialyse-Schläuche (MWCO 12000 – 14000) vor ihrem Gebrauch in *A. bidest.* gekocht und anschließend mehrfach mit *A. dest.* gespült. Die Aufbewahrung vorbehandelter Schläuche erfolgte in Ethanol (20% (v/v)) bei 4°C. Die Dialyse-Schläuche (MWCO 4000 – 6000) wurden vor ihrer Verwendung 20 min in *A. bidest.* gewässert und anschließend ebenfalls mehrfach mit *A. dest.* gespült. Die Dialyse wurde bei 4°C für die Dauer von 4 – 6 h oder über Nacht durchgeführt.

3.5.5 Entsalzen mittels Gelfiltration

Die Entsalzung von Proteinlösungen oder Seren erfolgte mit Econo-Pac 10DG-Entsalzungssäulen (Bettvolumen: 10 ml) von BioRad oder PD-10 Entsalzungssäulen von

GE Healthcare und bei größeren Probevolumen mit einer HiPrep 26/10 Sephadex G-25 F-Säule (Bettvolumen: 53 ml) von Pharmacia. Die Gelfiltration ermöglicht die schnelle und einfache Trennung von Proteinen (Molmasse > 6000 Da) und niedermolekularen Substanzen, insbesondere von Salzen.

Die HiPrep-Chromatographie wurde mit einer FPLC-Anlage von Merck/Hitachi durchgeführt. Vor dem Probenauftrag wurde die Säule mit 100 – 150 ml eines geeigneten Puffers äquilibriert, und anschließend wurde die Proteinprobe aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 6 ml/min und die erhaltenen 6 ml Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE überprüft.

Die Econo-Pac 10DG- bzw. PD-10-Entsalzungssäulen wurden mit 20 ml eines geeigneten Puffers äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung (Maximalvolumen: 3 ml bzw. 2,5 ml) aufgetragen und vollständig in die Säule einlaufen gelassen. Die Proteine wurden mit 4 ml bzw. 3,5 ml Puffer eluiert und manuell in Fraktionen mit einem Volumen von 1 – 1,5 ml gesammelt. Die Fließgeschwindigkeit betrug bei diesem System ca. 1 ml/min. Die Bestimmung der proteinenthaltenden Fraktionen erfolgte entweder spektralphotometrisch durch den BCA-Assay oder durch SDS-PAGE.

3.6 Reinigung von Proteinen von *Streptomyces mobaraensis*

Zur Gewinnung von Proteinen aus dem Kulturmedium wurde *Streptomyces mobaraensis* im Komplexmedium kultiviert. Die Kultivierung zur Reinigung der Transglutaminase erfolgte hierbei mindestens 72 h, zur Gewinnung der Substratproteine 43 – 93 h.

Die durch Filtration von der Zellmasse getrennten Kulturüberstände wurden über Ethanolfällung konzentriert, ggf. entsalzt und umgepuffert. Die anschließende Chromatographie der Proteine erfolgte entweder mit einer Pharmacia-Standardchromatographie-Anlage oder der Merck-Hitachi-FPLC-Anlage. Die benötigten Puffer wurden mit *A. bidest.* angesetzt und vor der Chromatographie im Ultraschallbad entgast. Jede Säule wurde dabei mit dem 2 – 3 fachen Säulenvolumen eines geeigneten Puffers äquilibriert, um den notwendigen pH-Wert einzustellen. Die Elution der Proteine während des Chromatographie-Verlaufs wurde durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Proteintrennung erfolgte bei Raumtemperatur, wobei die verwendeten Puffer bei 4°C gekühlt und die gesammelten Fraktionen direkt auf Eis gestellt wurden. Alle proteinenthaltenden Fraktionen wurden durch Enzymaktivitäts- und Inhibierungstests, SDS-PAGE, Western Blots und Proteingehaltsbestimmungen charakterisiert. Fraktionen, welche das gleiche Protein

enthielten, wurden vereinigt und bei -20°C gelagert. Nach Abschluss des Verfahrens wurden die Säulen zunächst mit 0,2 M NaOH gespült und je nach Säule auf 20% (v/v) Ethanol oder 0,02% (w/v) Natriumazid bei Zimmertemperatur gelagert.

3.6.1 Auswahl des geeigneten Ionenaustauschers

Die Auswahl des geeigneten Ionenaustauschers erfolgte bei unbekannten Proteinen in einem Vorversuch in Eppendorf-Gefäßen, bei dem Anionen- und Kationenaustauschermaterialien mit einem geeigneten Puffer äquilibriert wurden. Anschließend wurden die Proteinextrakte, die das gesuchte Protein enthielten, mit den verschiedenen Säulenmaterialien inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit Äquilibrierpuffer erfolgte eine vollständige Elution mit 1 M NaCl im Äquilibrierpuffer. Eine Überprüfung der Bindung erfolgte durch Bestimmung der Aktivität oder SDS-PAGE.

3.6.2 Isolation von Transglutaminase und deren Substraten aus Kulturüberstand

Die vollständige Reinigung der Proteine aus den durch Ethanolfällung gereinigten Kulturüberständen erfolgte mittels FPLC (**F**ast **P**rotein **L**iquid **C**hromatographie) an einem stark sauren Kationenaustauschermaterial in Anlehnung an Gerber *et al.* (1994). Die Reinigung wurde, wenn nötig, durch eine zusätzliche Rechromatographie von teilgereinigten Fraktionen vervollständigt. Die Verwendung eines Puffers mit einem niedrigeren pH-Wert ermöglichte hierbei eine stärkere Bindung der Proteine an den Ionenaustauscher. Bei ansonsten gleichen Chromatographiebedingungen konnte dadurch eine weitergehende Reinigung der Transglutaminase und anderer Proteine erreicht werden.

Der Niederschlag der Lösungsmittelfällung wurde im jeweiligen Puffer A aufgenommen, so dass eine Konzentrierung der Proteinlösung erreicht wurde. Diese wurde zum Abtrennen größerer Partikel zentrifugiert (10000 rpm, 4°C , 10 min) und durch Sterilfiltration mit einem $0,45\ \mu\text{m}$ Spritzenfilter von Schwebstoffen befreit. Die Transglutaminase oder deren Substratproteine wurden entsprechend nachstehender Übersichten (Tab. 3.2, Tab. 3.3) aus dem Kulturüberstand gereinigt bzw. angereichert.

Tab. 3.2: Gewählte IA-Chromatographiebedingungen für die Teilreinigung von TGase und deren Substraten aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Stationäre Phase	Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 (S)	
	Durchmesser: 1,0 – 2,6 cm	
	Betthöhe: 13 – 15 cm	
	Bettvolumen: 12 – 69 cm ³	
Mobile Phasen	50 mM Natrium-Acetat pH 5,0 oder pH 4,0	(Puffer A)
	1 M NaCl in Puffer A	(Puffer B)
Flussrate	1 – 6,5 ml/min	
Fraktionen	2 – 6,5 ml	

Tab. 3.3: Zeitlicher Verlauf einer IA-Chromatographie für die Reinigung von TGase und deren Substraten aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Funktion	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Volumen (ml)
Auftrag der Proteinlösung	-	-	bis max. 90 ml
Durchlauf nichtbindender Proteine	100	-	100 – 250 ml
Linearer Gradient	100 – 0	0 – 100	200 – 1300 ml

Vor Durchführung einer Rechromatographie wurden die entsprechenden Fraktionen entsalzt und auf den geeigneten Puffer eingestellt. Nach Sterilfiltration wurde die Proteinlösung auf die entsprechend äquilibrierte Säule aufgetragen.

3.7 Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem Tris-Glycin-Puffersystem. Dabei dient Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Tensid dazu, die Eigenladung der Proteine zu überdecken, indem es denaturierend wirkt und durch Bindung an hydrophobe Aminosäuren dem Protein gleichmäßig verteilte, negative Ladungen gibt. Aufgrund dessen, dass Glycin im Elektrophoresepuffer die Sequenzanalyse von Proteinen verfälscht, und der besseren Auflösung im Bereich zwischen 10 und 50 kDa wurde für zu sequenzierende Proteine ein Boratgelsystem verwendet. Die Durchführung aller Gelelektrophoresen fand mit einer Mini Protean III

Apparatur statt. Die Komponenten wurden entsprechend der in Tab. 3.4 oder Tab. 3.5 aufgeführten Reihenfolge hintereinander zusammengegeben und gut durchmischt. Das Trenngel wurde gegossen und für die Dauer der Polymerisation (ca. 45 min) mit Isopropanol überschichtet. Die Größe der Trenngele betrug ca. 83 x 53 mm, die Stärke variierte zwischen 0,75 und 1,5 mm. Analog erfolgte die Präparation des Sammelgels. Nach Einsetzen der Kämme und Polymerisation wurden die Gele sofort verwendet oder maximal eine Woche in feuchten Tüchern bei 4°C aufbewahrt. Die proteinenthaltenden Proben wurden mit einem für das Gelsystem angegebenen Auftragspuffer versetzt, der SDS im Überschuss enthielt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine für 5 min bei 90°C, indem durch das Erhitzen Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufbrechen von Wasserstoffbrücken und Strecken der Moleküle geöffnet werden. Nach Einfüllen des jeweiligen Elektrodenpuffers und Applikation der Proben wurden die Proteine bei einer konstanten Spannung von 200 V bzw. von 150 V bei Verwendung des Boratgelsystems getrennt. Mit dem Auslaufen des im Auftragspuffer enthaltenen Bromphenolblau nach ca. 45 bzw. 180 min wurde die Elektrophorese beendet. Die Proteine wurden anschließend entweder mit Silbernitrat gefärbt, auf eine NC-Membran transferiert oder nach Fluoreszenzmarkierung durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm visualisiert. Die Zuordnung der Molmasse erfolgte anhand von Markerproteinen definierter Molmassen.

3.7.1 Analytische Tris-Glycin-Gele

Analytische Tris-Glycin-Gele wurden nach der Vorschrift von Laemmli *et al.* (1970) hergestellt (Tab. 3.4). Die Bedienung der Elektrophoresekammer erfolgte entsprechen der Gerätebeschreibung des Herstellers.

Acrylamidlösung:	29,2% (w/v)	Acrylamid
	0,8% (w/v)	Bisacrylamid
Elektrodenpuffer:	192 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
	25 mM	Tris-HCl
		pH 8,9

Auftragspuffer:	4% (w/v)	SDS
	25% (w/v)	Harnstoff
	25% (w/v)	Glycerin
	0,01% (w/v)	gesätt. Bromphenolblaulösung

(wenn gesondert vermerkt, enthielt der Auftragspuffer 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfidbrücken)

Tab. 3.4: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.

Komponente	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
Acrylamidlösung	5,0 ml	1,32 ml
1 M Tris-HCl pH 8,9	4,5 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,0 ml
A. bidest.	2,2 ml	5,5 ml
20% (w/v) SDS	60 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10% (w/v) APDS	100 µl	100 µl

3.7.2 Boratgele

Boratgele wurden nach der Vorschrift von Poduslo *et al.* (1981) hergestellt (Tab. 3.5).

Acrylamidlösung:	29,2% (w/v)	Acrylamid
	0,8% (w/v)	Bisacrylamid
Elektrodenpuffer:	0,1 M	Glycin
(P1-Puffer)	0,1 M	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	SDS
		pH 8,3

Gelpuffer:	3 M	Tris-Base
(P2-Puffer)	3 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
	0,4% (w/v)	SDS
		pH 8,3
Sammelgelpuffer:	0,4% (w/v)	SDS
	0,4 M	Tris-HCl
		pH 6,8
Auftragspuffer:	4 ml	P1-Puffer
	11 ml	<i>A. bidest.</i>
	1 ml	gesätt. Bromphenolblaulösung
	5 g	Saccharose
	2% (w/v)	SDS

Tab. 3.5: Pipettierschema zur Herstellung von Boratgelen.

Komponente	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
Acrylamidlösung	5,0 ml	1,32 ml
Gelpuffer P2	4,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,0 ml
<i>A. bidest.</i>	2,2 ml	5,5 ml
20% (w/v) SDS	60 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10% (w/v) APDS	100 µl	100 µl

3.7.2.1 Protein-Molekulargewichtsstandards

Zur Abschätzung der Molmasse elektrophoretisch getrennter Proteine wurde bei jedem Gel auf mindestens eine der Spuren ein Gemisch von Markerproteinen aufgetragen. Mit Ausnahme von Gelen, die für Western Blots vorgesehen waren, wurde hierfür der SDS-Proteinstandard von Sigma verwendet. Für Blots wurde der vorgefärbte Proteinstandard von AppliChem eingesetzt. Die Zusammensetzungen der beiden Marker sind in Tab. 3.6 und Tab. 3.7 aufgeführt.

Tab. 3.6: **Zusammensetzung des Sigma-SDS-Proteinmarkers.**

Protein	Herkunft	Molmasse (kDa)
Myosin	Kaninchenmuskel	205
β -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	116
Phosphorylase B	Kaninchenmuskel	97,4
Serumalbumin	Rind	66
Ovalbumin	Hühnerei	45
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	29
Trypsininhibitor	Sojabohne	20,1
α -Lactalbumin	Kuhmilch	14,2

Tab. 3.7: **Zusammensetzung des vorgefärbten AppliChem-Proteinmarkers.**

Protein	Herkunft	Molmasse (kDa)
Myosin	Rind	200
β -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	116
Serumalbumin	Rind	68
Ovalbumin	Hühnerei	43
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	30
Trypsininhibitor	Sojabohne	20
Lysozym	Hühnerei	14,4
Aprotinin	Rinderlunge	6,5

3.7.3 Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierung (IEF) ist die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen in einem Gel aufgrund ihres Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten. Diese tragen in Abhängigkeit vom pH des umgebenden Mediums negative oder positive Ladungen. Bei einem pH-Wert, der dem isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins entspricht, beträgt dessen Nettoladung gleich null, da gleich viele gegensätzlich geladene Seitenketten vorliegen. Daher ist die elektrophoretische Beweglichkeit am pI ebenfalls null. Für die IEF werden Gele mit Träger-Ampholyten, das sind kleine, lösliche, amphotere Moleküle mit einer hohen Pufferkapazität in der Nähe ihres eigenen pI's, verwendet, die bei Anlegen eines elektrischen Feldes einen stabilen pH-Gradient ausbilden. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Nettoladung zu dem pH-Wert, der ihrem pI entspricht.

Zur Bestimmung des *pI* von Proteinen wurden eine Horizontalgelelektrophorese-Apparatur und SEVALYT PRECOTES-Fertiggele pH 3 – 10 oder Blank PRECOTES-Gele der Fa. Serva verwendet. Die letzteren Gele mussten vor der isoelektrischen Fokussierung mit SERVALYT Trägerampholyten äquilibriert werden. Dazu wurden sie nach dem Entfernen der Deckfolie mit der Gelseite nach unten zuerst 5 min unter leichtem Schütteln in *A. dest.* gewaschen und anschließend mind. 30 min unter leichtem Schütteln in der Äquilibrierlösung mit der Ampholytmischung inkubiert. Abschließend wurde die Folienseite mit *A. dest.* abgespült, und das Gel wurde max. 30 min getrocknet.

Nach dem Temperieren der horizontal angeordneten Kühlplatte auf 5 °C wurde etwa 1 ml Silikonöl gleichmäßig auf der Platte verteilt. Anschließend wurden das Gel, die in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkten Elektrodendochte sowie der Applikatorstreifen aufgelegt. 10 – 15 µl einer gegebenenfalls entsalzten Proteinlösung (Salzkonzentration < 50 mM) wurden in die Taschen des Applikatorstreifens pipettiert. Die Höchstleistung der Spannungsquelle wurde auf 6 – 12 W (für ein Gel der Abmessung 125 mm x 125 mm), die Endspannung auf 2000 V begrenzt. Die Fokussierung lief über einen Zeitraum von etwa 2,5 – 3,5 h. Die Proteine wurden danach mit Silbernitrat gefärbt (3.8.3).

Äquilibrierlösung:	1,2 ml	SERVALYT 7 – 9
(Gelformat 125 x	0,8 ml	SERVALYT 9 – 11
125 mm, ohne	2,8 ml	Glycerin (87%)
Harnstoff)	ad 25 ml	<i>A. dest.</i>

Anodenpuffer:	0,17 g	L-Asparaginsäure
(Fertiglösung, Serva)	0,18 g	L-Glutaminsäure
	ad 50 ml	<i>A. dest.</i>

Kathodenpuffer:	0,22 g	L-Arginin
(Fertiglösung, Serva)	0,18 g	L-Lysin
	6 ml	Ethylendiamin
	ad 50 ml	<i>A. dest.</i>

3.7.3.1 Markerproteine für die isoelektrische Fokussierung

Die Zuordnung der isoelektrischen Punkte erfolgte anhand einer käuflichen Präparation von Markerproteinen (Tab. 3.8).

Protein	Herkunft	Isoelektrischer Punkt
Cytochrom c	Pferdherz	10,7
Ribonuclease A	Rinderpankreas	9,5
Lectin	<i>Lens culinaris</i>	8,3; 8,0; 7,8
Myoglobin	Pferdmuskel	7,4; 6,9
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	6,0
β-Lactoglobulin	Kuhmilch	5,3; 5,2
Trypsininhibitor	Sojabohne	4,5
Glucoseoxidase	<i>Aspergillus niger</i>	4,2
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	3,5

3.8.1 Coomassie Brilliant Blau-Färbung

Färbelösung:	0,1% (w/v)	Coomassie Blue R 250
	50% (v/v)	Methanol, sequencing grade
Entfärbelösung:	50% (v/v)	Methanol, sequencing grade

Diese Methode nach Blum *et al.* (1987) zeichnet sich durch eine niedrige Nachweisgrenze von ca. 5 – 10 ng je Proteinbande, wodurch sie 10- bis 100-fach

empfindlicher als die Coomassie-Färbung ist, und einen hohen Kontrast aus. Bei der Silberfärbung bilden Ag^+ -Ionen mit den Aminosäureseitenketten von Glu, Asp und Cys bei pH-Werten über 10,5 Komplexe aus. Durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd wird gebundenes Ag^+ zu elementarem Silber reduziert. Dieses färbt die Stellen, an denen Proteine vorhanden sind, braun bis schwarz. Die Methode kann aber nur eingeschränkt zur Quantifizierung verwendet werden, da Silber je nach verwendetem Färbeprotokoll bestimmte Proteine besonders stark anfärbt und andere gar nicht. Außerdem ist die Silberfärbung nicht spezifisch für Proteine, sondern färbt auch alle negativ geladenen Biomoleküle wie Nucleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glycolipide.

Für die Färbung wurden die Polyacrylamid-Gele nach der Elektrophorese in eine Schale überführt und mit den Reagenzien von Tab. 3.9 in der angegebenen Reihenfolge behandelt.

Tab. 3.9: Verfahren zur Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Silbernitrat.

Schritt	verwendete Lösung	Dauer
Fixieren	Ethanol/Essigsäure/Wasser 50/12/38	mind. 1 h, möglichst über Nacht
Waschen	50% (v/v) Ethanol	3 x 20 min
Vorbehandeln	0,1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ad 500 ml A. dest.	1 min
Waschen	A. dest.	3 x 20 s
Imprägnieren	0,4 g AgNO_3 100 μl Formaldehyd ad 200 ml A. dest.	20 min
Waschen	A. dest.	3 x 20 s
Entwickeln	12 g Na_2CO_3 100 μl Formaldehyd ad 200 ml A. dest.	bis zur gewünschten Bandenintensität
Waschen	A. dest.	1 x 10 s
Stoppen	Ethanol/Essigsäure/Wasser 50/12/38	2 min

Abschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und dokumentiert.

3.8.3 Silberfärbung von IEF-Gelen

Für die Silberfärbung von IEF-Gelen wurde ein Protokoll der Fa. Serva verwendet. Die Gele wurden nach der Fokussierung in eine Schale überführt und entsprechend Tab. 3.10 behandelt.

Tab. 3.10: Verfahren zur Färbung von IEF-Gelen mit Silbernitrat (Serva-Protokoll).

Schritt	verwendete Lösung	Dauer
Fixieren	20% Trichloressigsäure (w/v)	20 min
Waschen	30% (v/v) Ethanol	10 min
Fixieren	80 ml Glutaraldehyd (25%) ad 1000 ml A. dest.	10 min
Waschen	30% (v/v) Ethanol	2 x 10 min
Vorbehandeln	40 mg Na ₂ S ₂ O ₃ ad 200 ml A. dest.	1 min
Waschen	A. dest.	3 x 20 s
Färben	200 mg AgNO ₃ 75 µl Formaldehyd (37%) ad 100 ml A. dest.	20 min
Waschen	A. dest.	2 x 20 s
Entwickeln	6 g Na ₂ CO ₃ 10 mg Na ₂ S ₂ O ₃ 75 µl Formaldehyd (37%) ad 100 ml A. dest.	bis zur gewünschten Bandenintensität
Stoppen	10% Essigsäure	5 min
Wässern	A. dest.	2 x 5 min
Trocknen	im warmen Luftstrom oder bei Zimmertemperatur	

Das Gel konnte sowohl nach dem Wässern als auch nach dem Trocknen dokumentiert werden.

3.9 Immunchemische Methoden

3.9.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Herstellung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen gegen das gereinigte fluoreszierende Zellwandpolymer wurde als externe Auftragsarbeit von der Firma Eurogentec, Seraing, Belgien durchgeführt, gegen die gereinigten Proteine DAIP bzw. SSTI von der Firma BioGenes, Berlin. Das fluoreszierende Zellwandpolymer wurde wie in den Abschnitten 3.14 und 3.5.1 beschrieben gereinigt, und die benötigte Antigenmenge von 0,4 mg pro Kaninchen wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 für vier Injektionen mit je 0,1 mg in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und gekühlt an Eurogentec verschickt. Die Immunisierung von zwei Kaninchen erfolgte über 3 Monate nach einem Standardprotokoll und es wurden 50 – 70 ml des Antiserums auf Trockeneis

geliefert. DAIP und SSTI wurden wie in den Abschnitten 3.5 und 3.6 beschrieben gereinigt, und die empfohlene Antigenmenge von ca. 0,5 mg des jeweiligen Proteins (0,5 – 1 mg/ml) wurde in PBS-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß ohne Kühlung an BioGenes verschickt. Die Immunisierung von je einem Kaninchen erfolgte nach einem Standardprotokoll. Nach 1,5 Monaten wurden jeweils etwa 40 – 55 ml der Antiseren auf Trockeneis geliefert.

PBS-Puffer:

8 g	NaCl
1,26 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄

ad 1 l A. bidest.

3.9.2 Isolierung von IgG aus Kaninchenserum

Die Reinigung der polyklonalen anti-Polymer-IgG, anti-DAIP-IgG und anti-SSTI-IgG aus Kaninchenserum von Albuminen, Lipoproteinen und Proteasen erfolgte mit DEAE Affi-Gel blue gel serum IgG purification columns der Firma BioRad. In einem ersten Schritt musste das Serum mittels BioRad Econo-Pac 10DG bzw. GE Healthcare PD-10 Entsalzungssäulen auf den Applikationspuffer, wie in Methode 3.5.5 beschrieben, umgepuffert werden. Vor dem Auftrag der Serumproben wurden die DEAE Affi-Gel blue gel Säulen mit 30 ml Applikationspuffer äquilibriert. Nach Auftragung von 2,75 ml umgepuffertem Kaninchenserum auf die 10 ml Säule erfolgte die Elution der IgG's mit 20 ml Applikationspuffer. Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml wurden gesammelt, und ihre Extinktion bzw. ihr Proteingehalt wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm oder durch BCA-Assay bestimmt. Fraktionen mit einer optischen Dichte > 0,6 oder einer Proteinkonzentration > 0,5 mg/ml wurden vereinigt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das Reinigen der DEAE Affi-Gel blue gel Säulen von gebundenem Albumin vor dem nächsten Lauf erfolgte mit 20 ml Waschpuffer, das Regenerieren mit 20 ml Regenerationspuffer. Nach Abschluss der Arbeiten wurden die Säulen in Applikationspuffer mit 0,02% NaN₃ bei 4°C gelagert.

Applikationspuffer:

28 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl
	pH 8,0

Waschpuffer: 1,4 M NaCl
 20 mM Tris-HCl
 pH 8,0

Regenerationspuffer: 28 mM NaCl
 1,5 M NaSCN
 20 mM Tris-HCl
 pH 8,0

3.9.3 Dot Blot

Zur Überprüfung der Antigen-Antikörper-Bindung wurden die gereinigten Antikörper gegen das fluoreszierende Zellwandpolymer, DAIP und SSTI mit den entsprechenden Antigenen durch Dot Blots untersucht. Dazu wurden jeweils 2 µl von fünf verschiedenen Konzentrationen der beiden Proteine oder dem Zellwandpolymer (500 – 62,5 µg/ml) auf je sechs Streifen einer Nitrocellulosemembran pipettiert. Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Membranen in Kunststoffschalen überführt und mit Magermilchpuffer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen behandelt (vgl. 3.9.5). Die immunchemische Färbung (3.9.5) erfolgte mit verschiedenen Erstantikörperversdünnungen gegen das fluoreszierende Zellwandpolymer, DAIP und SSTI von 1:2000 bis 1:60000 in TBST-Puffer.

3.9.4 Western Blot

Die zu untersuchenden Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe getrennt, und anschließend durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und sind nun für die Antikörperbindung zugänglich. Nach diesem Vorgang kann das an den Proteinen haftende SDS durch Waschen entfernt werden. Dadurch können die Proteine wieder renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen, nicht aber die Quartärstruktur, wieder annehmen. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte mit einer Semi-Dry Blot-Apparatur mit Platin/Edelstahl-Elektroden und dem Transferpuffer-System nach Towbin *et al.* (1979). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel von den SDS-Polyacrylamid-Gelen entfernt und das Trenngel 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Drei Filterpapiere

und die Nitrocellulose(NC)-Membran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau des Western Blots erfolgte wie in Abb. 3.1 dargestellt beginnend auf der Anode der Blot-Apparatur.

Transferpuffer:	39 mM	Glycin
	1,3 mM	SDS
	48 mM	Tris-HCl, pH 9,1
	20% (v/v)	Methanol

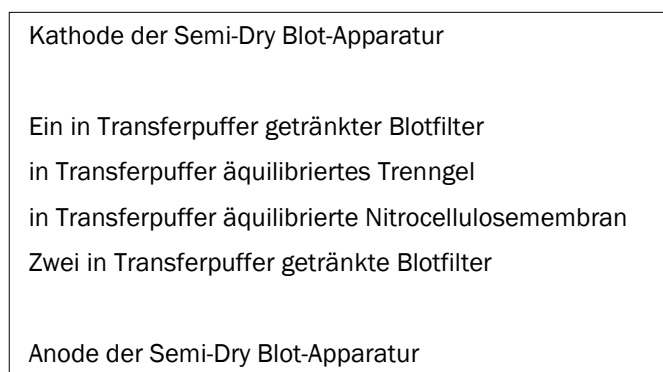


Abb. 3.1: Schichtaufbau eines Western Blots für den spannungsinduzierten Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran.

Der Proteintransfer auf die NC-Membran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 20 V. Nach 60 – 120 min, je nach Molmasse der zu transferierenden Proteine, wurde die Membran in eine Kunststoffschale mit TBST-Puffer überführt und immunchemisch gefärbt.

3.9.5 Immunchemische Färbung

Der Nachweis der immobilisierten Antigene nach Western oder Dot Blot erfolgte zweistufig mit spezifischen Erstantikörpern und Zweitantikörpern, die gegen die ersten gerichtet und mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Der Nachweis der Proteine erfolgte dabei durch eine Farbreaktion mit den artifizialen, löslichen Substraten BCIP und NBT, die in einen unlöslichen, blauen Farbstoff konvertiert werden, der in der Umgebung des Enzyms präzipitiert und die Nitrocellulosemembran dabei anfärbt.

TBST-Puffer:	150 mM	NaCl
	0,05% (v/v)	Tween 20
	10 mM	Tris-HCl
		pH 8,0
TBST-Blotto:	2,5 g	Magermilchpulver
	50 ml	TBST
Erstantikörperlösung:	2 – 15 µl	gereinigte Kaninchen-IgG
	30 ml	TBST
Zweitantikörperlösung:	2 µl	Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat
	30 ml	TBST
Äquilibrierpuffer/ Färbepuffer:	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	100 mM	Tris-HCl
		pH 9,5
NBT-Lösung:	75 mg	NBT
	ad 1 ml	70% DMF
BCIP-Lösung:	50 mg	BCIP
	ad 1 ml	DMF
Substratlösung:	66 µl	NBT-Lösung
	51 µl	BCIP-Lösung
	15 ml	Äquilibrierpuffer/Färbepuffer
Stopppuffer:	5 mM	EDTA
	20 mM	Tris-HCl
		pH 8,0

Die einzelnen Verfahrensschritte der immunchemischen Färbung sind in Tab. 3.11 dargestellt. Alle Inkubationen erfolgten bei Zimmertemperatur (ZT) auf einem Schüttler.

Tab. 3.11: Verfahren zur Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.

Schritt	verwendete Lösung	Dauer
Waschen	TBST	3 x 5 min
Sättigen	TBST-Blotto	60 min
Waschen	TBST	3 x 5 min
Erstantikörperbindung	Erstantikörperlösung	90 min
Waschen	TBST	3 x 5 min
Zweitantikörperbindung	Zweitantikörperlösung	90 min
Waschen	TBST	3 x 5 min
Äquilibrieren	Äquilibrierpuffer/Färbepuffer	1 min
Farbreaktion	Substratlösung	bis zur gewünschten Bandenintensität
Stoppen	Stopppuffer	1 min
Waschen	A. dest.	1 min

Im Anschluss an die Färbung wurden die Blots dokumentiert und zur weiteren Aufbewahrung unter Lichtausschluss zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

3.10 Molekulargewichtsbestimmungen

3.10.1 SDS-PAGE

Die Markerproteinmischung und die Proben unbekannten Molekulargewichts wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Durch halblogarithmische Auftragung der bekannten Molekulargewichte der Eichproteine gegen die Laufstrecken wurde das unbekannte Molekulargewicht der Probe ermittelt.

3.10.2 Gelpermeationschromatographie

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mit einer HiLoad 16/60 Superdex 75 oder 200 prep grade GPC-Säule (Bettvolumen: 120 ml) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Vor Aufgabe der Probe wurde die Säule mit dem 2-fachen Bettvolumen an Laufpuffer äquilibriert. Zur Kalibrierung wurde eine Mischung der in Tab. 3.12 aufgelisteten Proteine

vor der eigentlichen Probe getrennt. Die halblogarithmische Auftragung der Molekulargewichte der Eichproteine gegen die Retentionszeiten lieferte die unbekannte Molmasse der Probe.

Laufpuffer: 150 mM NaCl
 50 mM Tris-HCl
 pH 7,0

Tab. 3.12: Eichproteine zur Bestimmung des Molekulargewichts durch GPC.

Protein	Herkunft	Molmasse (kDa)
Blue Dextran		2000
Alkoholdehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	150
Serumalbumin	Rind	66
Ovalbumin	Hühnerei	45
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	29
Cytochrom C	Rinderherz	12,4

Die GPC-Säule wurde mit 0,2 M NaOH gereinigt und mit 20% (v/v) Ethanol konserviert.

3.11 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wässriger Lösungen erfolgte nach der Bicinchoninsäure-Methode nach Smith *et al.* (1985). Das Verfahren wurde in Anlehnung an Sorensen und Brodbeck (1986) sowie Redinbaugh und Turley (1986) in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Proteine reduzieren in alkalischer Lösung Kupfer(II)- zu Kupfer(I)-Ionen. Diese dem BCA-Test zugrunde liegende Reaktion wird als Biuret-Reaktion bezeichnet. Dafür sind in erster Linie Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und Peptidverbindungen verantwortlich. Die einwertigen Kupferionen bilden mit dem Na⁺-Salz der Bicinchoninsäure (BCA) eine Komplexverbindung mit violetter Farbe, dessen Extinktion mit der Proteinkonzentration korreliert und der durch Messung der Extinktion bei 562 nm quantifiziert werden kann. Die Proteinkonzentration wird mit Hilfe einer analog behandelten Serumalbumin-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen (0 – 1 mg/ml) bestimmt. Die Testlösung setzte sich aus den bei der Firma Interchim erhältlichen Reagenzien zusammen:

Reagenz A:	1% (w/v)	Bicinchoninsäure Dinatriumsalz
	2% (w/v)	Natriumcarbonat
	0,16% (w/v)	Natriumtartrat
	0,4% (w/v)	Natriumhydroxid
	0,95% (w/v)	Natriumhydrogencarbonat pH 11,25 (NaOH)

Reagenz B: 4% (w/v) Kupfersulfat

Testlösung: 15 ml Reagenz A + 300 µl Reagenz B

Je 200 µl der Testlösung wurde in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und je 25 µl einer BSA-Verdünnungsreihe (1000, 500, 250, 125, 62,5 und 0 µg/ml) bzw. je 25 µl der zu analysierenden Proteinlösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C erfolgte unmittelbar die Messung der Absorption des Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 550 nm. Mit den Werten der BSA-Verdünnungsreihe wurde durch das Mikrowin2000-Programm, welches mit dem Lesegerät gekoppelt ist, eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

3.12 Bestimmung von Proteaseaktivität

Für alle Assays zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurden Stammlösungen der Enzyme Subtilisin A von *Bacillus licheniformis*, Dispase von *B. polymyxa*, Trypsin von *Bos taurus*, Thermolysin von *B. thermoproteolyticus rokko* und α-Chymotrypsin von *Bos taurus* in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM CaCl₂, sowie Papain von *Carica papaya* und Bromelain von *Ananas comosus* in 0,1 M Natriumcitrat pH 6,5 mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Zur Bestimmung der genauen Enzym/Inhibitor – Verhältnisse wurde von allen Stammlösungen der Proteingehalt mittels Bicinchoninsäure-Test bestimmt.

3.12.1 Anson-Casein-Test

Die Bestimmung der allgemeinen unspezifischen proteolytischen Aktivität von Proteasen erfolgte nach einer ursprünglich von Anson (1938) mit Hämoglobin entwickelten Methode. Sie wurde als Anson-Casein-Test, modifiziert durch Yang und Huang (1994), angewandt. Hierbei wird an Stelle von Hämoglobin Casein durch die anwesende Protease

partiell hydrolysiert. Nicht abgebautes Protein wird mit TCA gefällt. Die Quantifizierung der proteolytischen Aktivität erfolgt an Hand von löslichem Tyrosin bzw. Tyrosinpeptiden im Überstand, was bei einer Wellenlänge von 280 nm spektrometrisch erfasst wird.

Proteasepuffer:	1 M	Tris-HCl
(Subtilisin A, Dispase, Trypsin, Thermolysin, α -Chymotrypsin)	20 mM	CaCl ₂
		pH 7,5

Proteasepuffer:	1 M	Natriumcitrat
(Papain, Bromelain)		pH 6,5

Casein-Lösung:	1% (w/v)	alkalilösliches Casein
(Subtilisin A, Dispase, Trypsin, Thermolysin, α -Chymotrypsin)	20% (v/v)	0,02 M NaOH
	0,1 M	Tris-HCl
		pH 7,5

Casein-Lösung:	1% (w/v)	alkalilösliches Casein
(Papain, Bromelain)	20% (v/v)	0,02 M NaOH
	0,1 M	Natriumcitrat
		pH 6,5

Stoppreagenz:	10% (w/v)	Trichloressigsäure
---------------	-----------	--------------------

Die Aktivitätsbestimmung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. In Tab. 3.13 ist das Pipettierschema des Assays dargestellt. Nach Abbruch der Reaktion mit TCA und Zentrifugieren für 5 min wurde der Überstand in UV-Küvetten überführt und die Extinktion bei 280 nm spektrometrisch erfasst.

Tab. 3.13: Pipettierschema zur Bestimmung der Proteaseaktivität in UV-Küvetten.

	Reagenzien	Analysenansatz	Reagenzienblindwert
Ansatz	Proteasepuffer Protease <i>A. bidest.</i>	20 µl 5 – 10 µl 170 – 175 µl	20 µl - 180 µl
Temperieren		Casein-Lösung für 5 min bei 37 °C	
Reaktionsstart	Casein-Lösung	200 µl	200 µl
Inkubation		10 min bei 37 °C	
Termination	Stoppreagenz	600 µl	600 µl
		kräftig schütteln	
Zentrifugation zum Abtrennen präzipitierter Proteine		5 min, 10000 rpm	
Bestimmung der Extinktion		unmittelbar im Anschluss bei 280 nm	

Die Enzymaktivität einer Protease ist definiert als die Freisetzung von 1 µmol Tyrosin pro min. Die Volumenaktivität der eingesetzten Proben errechnet sich aus der gemessenen Extinktionsdifferenz wie folgt:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot t}$$

mit ΔE Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Blindwert
 V Gesamtvolumen (1 ml)
 ε molarer Extinktionskoeffizient Tyrosin (1,220 ml/µmol·cm)
 d Schichtdicke der Küvette (1 cm)
 v Probenvolumen (0,2 ml)
 t Reaktionszeit (10 min)

Anhand der gegebenen Größen ließ sich die Volumenaktivität einer Protease nach folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]_{280\text{nm}} = \Delta E \cdot 0,410 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

3.12.2 Aktivitätstest für P1-Proteasen

Die spezifische Bestimmung der Aktivität von P1-Endoproteasen ist mit synthetischen Aminosäure- oder Peptid-*para*-Nitroaniliden möglich, die N-seitig eine Schutzgruppe tragen. Durch Proteolyse des farblosen Substrates wird gelbes *para*-Nitroanilin freigesetzt, dessen Zunahme photometrisch verfolgt werden kann.

Proteasepuffer:	1 M	Tris-HCl
(Subtilisin A, Trypsin)	20 mM	CaCl ₂
		pH 7,5

Substratlösung:	4 mM	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
(Subtilisin A)		in DMSO

Substratlösung:	4 mM	Bz-Arg-pNA
(Trypsin)		in DMSO

Stoppreagenz:	10 mM	PMSF
(Subtilisin A)		in DMSO

Stoppreagenz:	5 mM	PMSF
(Trypsin)		in DMSO

Die Aktivitätsbestimmung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Bei Messung der Aktivität von Subtilisin betrug der Gesamtanteil DMSO am Assayvolumen 10%, bei Trypsin 40%. In Tab. 3.14 ist das Pipettierschema des Assays dargestellt. Nach Abbruch der Reaktion mit Stoppreagenz wurde der Überstand in Küvetten überführt und die Extinktion bei 405 nm spektrometrisch erfasst.

Tab. 3.14: Pipettierschema zur Bestimmung der P1-Proteaseaktivität in 1 ml-Küvetten.

	Reagenzien	Analysenansatz		Reagenzienblindwert
		Subtilisin	Trypsin	
Ansatz	DMSO 4 mM Nitroanilid-Lösung Proteasepuffer	- 50 µl 440 µl	150 µl 50 µl 278,6 µl	0 – 150 µl 50 µl 300 – 450 µl
Temperieren		für 10 min bei 37 °C		
Reaktionsstart	Protease-Lösung	10 µl	21,4 µl	-
Inkubation		10 min bei 37 °C		
Termination	Stoppreagenz	500 µl	500 µl	500 µl
Bestimmung der Extinktion		unmittelbar im Anschluss bei 405 nm		

Eine Enzymeinheit U ist hierbei als Freisetzung von 1 µmol *para*-Nitroanilin pro Minute definiert. Die Volumenaktivität der eingesetzten Proben errechnet sich aus der gemessenen Extinktionsdifferenz wie folgt:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot t}$$

mit ΔE Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Blindwert
 V Gesamtvolumen (1 ml)
 ε molarer Extinktionskoeffizient
para-Nitroanilin: 17,955 ml µmol⁻¹ cm⁻¹ (Tris-HCl pH 7,5 + 10% DMSO)
9,962 ml µmol⁻¹ cm⁻¹ (Tris-HCl pH 7,5 + 40% DMSO)
 d Schichtdicke der Küvette (1 cm)
 v Probenvolumen (0,1 ml)
 t Reaktionszeit (10 min)

Anhand der gegebenen Größen ließ sich die Volumenaktivität einer Protease nach folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Subtilisin:} \quad \text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]_{405\text{nm}} = \Delta E \cdot 0,056 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

$$\text{Trypsin:} \quad \text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]_{405\text{nm}} = \Delta E \cdot 0,100 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

3.12.3 Fluoreszenz-Aktivitätstest für P1'-Endoproteasen mit Dabcyl-Ser-Phe-EDANS

Eine Methode zur Bestimmung der P1'-Endoproteaseaktivität bietet der Fluoreszenz-Aktivitätstest mit dem gequenchten Fluoreszenz-Dipeptid Dabcyl-Ser-Phe-EDANS (DabSFans) nach Weimer *et al.* (2006). Die intrinsische Fluoreszenz von Ethylendiaminonaphthalinsulfonsäure (EDANS) ist hier durch den benachbarten Azofarbstoff Dimethylaminoazobenzolcarboxyl (Dabcyl) gequenchet. Der Assay beruht auf der Hydrolyse der einzigen Peptidbindung des Moleküls zwischen den Aminosäuren Serin und Phenylalanin, was einen Anstieg der Fluoreszenz zu Folge hat, anhand dessen die proteolytische Aktivität quantifiziert werden kann. Detektiert wird die Fluoreszenz des freigesetzten Phe-EDANS bei einer Excitationswellenlänge von 336 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm.

Proteasepuffer:	1 M	Tris-HCl
(Dispase,	20 mM	CaCl ₂
Thermolysin)		pH 7,5

Proteasepuffer:	1 M	Tris-HCl
(TAMEP)	20 mM	CaCl ₂
		pH 6,5

Substratlösung:	1,3 mM	Dabcyl-Ser-Phe-EDANS
	10% (v/v)	DMSO
		in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5

Stoppreagenz:	20 mM	EDTA
---------------	-------	------

Der Assay wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nach Abbruch der proteolytischen Reaktion mit EDTA wurde der Überstand in 1 cm-Fluoreszenz-Küvetten überführt und die Messungen mit dem Fluoreszenz-Spektrometer F-7000 (Hitachi) mit zugehöriger Software FL Solution 2.0 (Excitationsspalt 5 nm / Emissionsspalt 5 nm) durchgeführt. Nachstehend ist in Tab. 3.15 das vollständige Pipettierschema des Assays dargestellt.

Tab. 3.15: Pipettierschema zur Bestimmung der P1'-Endoproteaseaktivität in 1 cm-Fluoreszenz-Küvetten.

	Reagenzien	Analysenansatz	Reagenzienblindwert
Ansatz	Proteasepuffer Protease <i>A. bidest</i>	50 µl 10 – 50 µl 385 – 425 µl	50 µl - µl 300 – 450 µl
Temperieren		für 10 min bei 37 °C	
Reaktionsstart	Substrat-Lösung	15 µl	15 µl
Inkubation		10 min bei 37 °C	
Termination	Stoppreagenz	500 µl	500 µl
Bestimmung der Emission		unmittelbar im Anschluss bei 490 nm (Exitationswellenlänge 336 nm)	

Die Enzymaktivität ist definiert als die Hydrolyse von 1 nmol Dabcyl-Ser-Phe-EDANS pro min. Die Volumenaktivität der eingesetzten Proben errechnet sich aus den gemessenen Emissionen wie folgt:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta I \cdot V}{F \cdot t}$$

mit I Emission zum Zeitpunkt t bei 490 nm
 I_0 Emission zum Zeitpunkt 0 bei 490 nm
 ΔI $I - I_0$
 F Anstieg der Fluoreszenzintensität (Excitationsspalt 5 nm / Emissionsspalt 5 nm) um 3,7 relative Fluoreszenzeinheiten (rfu) bei Spaltung von 1 nmol Dipeptid pro ml.
 t Reaktionszeit (10 min)

3.12.4 Inhibierungsversuche

Zur Charakterisierung isolierter TGase-Substrate wurden deren mögliche Inhibitoreigenschaften untersucht. Dazu wurden die in 3.12.1 bis 3.12.3 beschriebenen Aktivitätstests in modifizierter Form verwendet. Das zu untersuchende, gereinigte Protein wurde mit den Proteasen in verschiedenen molaren Verhältnissen gemischt und für 30 min bei ZT vorinkubiert, wobei Ansätze ohne Effektor als Positivkontrollen dienten. Anschließend erfolgten die Tests zur Bestimmung der Restaktivität der jeweiligen Protease in der in Tab. 3.13, Tab. 3.14 oder Tab. 3.15 aufgeführten Reihenfolge. Zur

Berechnung der relativen Inhibitoraktivität wurde die Volumenaktivität der mit dem Inhibitor inkubierten Protease von der Volumenaktivität der Kontrolle subtrahiert.

3.12.4.1 Bestimmung von Inhibitorkonstanten

Zur Bestimmung der Inhibitorkonstanten (K_i -Werte) von SSTI gegen Subtilisin A und Trypsin wurde eine Dixon-Auftragung verwendet. Sie ermöglicht die direkte Bestimmung der Inhibitorkonstante für eine kompetitive Hemmung (K_{ic}). Innerhalb einer Messreihe wird, bei jeweils konstant gehaltener Substratkonzentration, die Inhibitormenge (wenigstens 5 Konzentrationen) verändert. Für verschiedene Substratkonzentrationen (wenigstens drei) ergibt sich eine Geradenschar, deren gemeinsamer Schnittpunkt abhängig vom relativen Verhältnis der Hemmkonstanten, im zweiten oder dritten Quadranten, bzw. bei Gleichheit der Konstanten auf der Abszisse liegt. Die x-Koordinate hat den Wert $-K_i$, die y-Koordinate $(1-K_{ic}/K_{iu})/V$. Allerdings kann mit dieser Methode nicht zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver ($K_{ic} < K_{iu}$) Hemmung unterschieden werden, da für beide das gleiche Geradenmuster mit gemeinsamem Schnittpunkt im zweiten Quadranten resultiert.

Für die Messungen wurde die in 3.12.2 beschriebene Methode in modifizierter Form verwendet. Die Tests zur Bestimmung der Restaktivität der jeweiligen Protease erfolgten wie in Tab. 3.16 aufgeführt. Fünf verschiedene SSTI-Konzentrationen wurden mit 2 – 4 mM des jeweiligen Proteasesubstrates vorinkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Protease in konstanter Konzentration, wobei Ansätze ohne Effektor als Positivkontrollen dienten.

Tab. 3.16: Pipettierschema zur Bestimmung der Inhibitorkonstanten in 1 ml-Küvetten.

	Reagenzien	Analysenansatz		Reagenzienblindwert
		Subtilisin	Trypsin	
Ansatz	DMSO	0 – 25 µl	150 – 175 µl	0 – 175 µl
	4 mM Nitroanilid-Lösung	25 – 50 µl		25 – 50 µl
	Proteasepuffer	430 – 440 µl	270 – 278,6 µl	291,4 – 450 µl
	Inhibitorlösung	0 – 10 µl	0 – 8,6 µl	0 – 10 µl
Temperieren		für 10 min bei 37 °C		
Reaktionsstart	Protease-Lösung	10 µl	21,4 µl	-
Inkubation		10 min bei 37 °C		
Termination	Stoppreagenz	500 µl	500 µl	500 µl
Bestimmung der Extinktion		unmittelbar im Anschluss bei 405 nm		

3.13 Methoden zur Sequenzanalyse auf Aminosäureebene

Die Aminosäuresequenz belegt Identität bzw. Homologie mit in Datenbanken abgelegten Proteinen.

Die Bestimmung der Primärstruktur erfolgte durch automatisierten Edman-Abbau oder Massenspektrometrie nach Trypsin-Verdau gereinigter Proteine. Die Aufklärung der aminoterminalen Aminosäure von Proteinen erfolgte direkt nach Gelelektrophorese und Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran.

3.13.1 Trennung von Proteinen mittels Borat-Gelelektrophorese und Transfer auf PVDF-Membranen

Proteinfragmente, deren Länge mindestens 60 Aminosäuren beträgt, können durch Borat-Gelelektrophorese getrennt werden. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran und anschließendem Anfärben mit Coomassie-Farbstoff (3.8.1) wurden die Proteine ausgeschnitten und direkt an ein Sequenzierlabor weitergegeben.

30 µl der gereinigten bakteriellen TGase-Substratproteine wurden mit Auftragspuffer versetzt und elektrophoretisch mit einem Borat-Puffersystem (3.7.2) getrennt. Anschließend wurden die Proteine bzw. die Proteinfragmente durch Semi-Dry Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Um die nachfolgende Sequenzierungsreaktion nicht zu

beeinträchtigen, wurde hierzu ein Puffersystem ohne Glycin nach Khyse-Andersen (1984) verwendet.

Anodenlösung 1:	0,3 M	Tris-HCl, pH 10,4
	20% (v/v)	Methanol, sequencing grade
Anodenlösung 2:	25 mM	Tris-HCl, pH 10,4
	20% (v/v)	Methanol, sequencing grade
Kathodenlösung:	40 mM	ϵ -Aminocapronsäure
	0,1% (w/v)	SDS
	25 mM	Tris-HCl, pH 9,4
	20% (v/v)	Methanol, sequencing grade

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel separiert und in Anodenlösung 2 äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte wie in Abb. 3.2 gezeigt, wobei die PVDF-Membran zuvor 30 s in Methanol geschwenkt und anschließend ebenfalls in Anodenlösung 2 äquilibriert wurde. Insgesamt sechs auf die Größe des Trenngels zugeschnittene Blotfilter sowie die Membran wurden in den entsprechenden Lösungen getränkt.

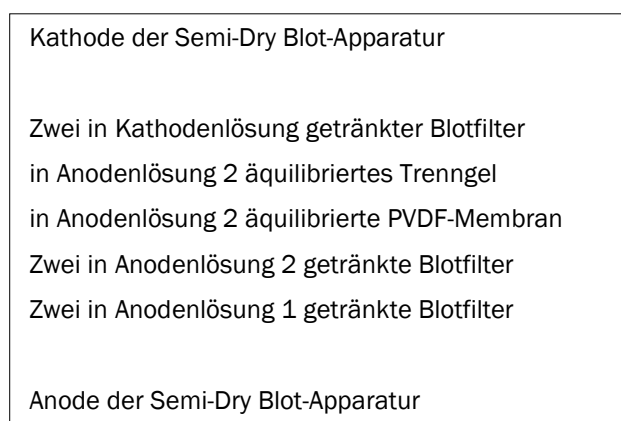


Abb. 3.2: Aufbau des Semi-Dry Blots nach Khyse-Andersen (1984) für den spannungsinduzierten Proteintransfer auf eine PVDF-Membran.

Der Transfer von Proteinen erfolgte bei einer konstanten Spannung von 20 V für die Dauer von bis zu 90 min. Im Anschluss daran wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (3.8.1). Nach dem Trocknen der Membran auf einem Blotfilter wurden distinkte

Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Lagerung der immobilisierten Proteine erfolgte bis zur Sequenzierung bei -20°C .

3.13.2 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Proteine

Die Sequenzierungen der auf PVDF-Membran transferierten Proteine wurden vom NMI in Reutlingen, einem Aninstitut der Universität Tübingen, durch automatisierten Edman-Abbau durchgeführt. Beginnend mit der jeweiligen N-terminalen Aminosäure wird die Peptidkette mit Phenylisothiocyanat sequentiell degradiert. Nachfolgend wird die freigesetzte Phenylthiohydantion (PTH)-Aminosäure durch Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie anhand ihrer Retentionszeit identifiziert.

3.14 Identifizierung physiologischer Substratproteine von bakterieller Transglutaminase

Die Zuordnung der biologischen Funktion der Transglutaminase von *S. mobaraensis* erfolgte durch Bestimmung von Substratproteinen in der Zellwand oder im Flüssigkulturmedium sowie gereinigter Proteine des Bakteriums.

3.14.1 Mechanischer Zellaufschluss

Nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 48 h im Flüssigmedium wurden die mycelartig wachsenden Mikroorganismen von *S. mobaraensis* durch Absaugen mit der Wasserstrahlvakuumpumpe vom Flüssigkulturmedium (Kulturüberstand) getrennt. Die Zellen wurden anschließend nach folgendem Schema unter Eiskühlung aufgeschlossen.

Tab. 3.17: Schema des Zellaufschlusses von *S. mobaraensis*.

Schritt	Durchführung		Anzahl
Waschen der Zellen mit PBS-Puffer	Zugabe des PBS-Puffers und kräftiges Durchmischen der Zellsuspension bis zur Homogenität, anschließend Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min)		3 x 15 min
NaCl-Auszug der Zellwände	Zugabe von 1 M NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 und Durchmischen bis zur Homogenität, anschließendes Schütteln der Zellwandsuspension		1 x min. 60 min
Waschen der Zellen mit PBS-Puffer	Zugabe des PBS-Puffers und heftiges Durchmischen bis zur Homogenität der Zellsuspension, anschließend Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min)		3 x 15 min
Mechanischer Aufschluss der gewaschenen Zellen	im Disintegrator auf Eis Zugabe von Glasperlen und PBS-Puffer und intensives Durchmischen bis zur einheitlich homogenisierten Zellmasse	im Mörser auf Eis Zugabe von PBS-Puffer und intensives Durchmischen bis zur einheitlich homogenisierten Zellmasse	20 min (Disintegrator)
Trennung von Cytosol und Zellwandfraktion	Zentrifugation bei 10000 rpm Überstand entspricht der „cytosolischen Fraktion“ Sediment entspricht den Zellwänden		1 x 10 min

Der gelblich viskose Überstand („cytosolische Fraktion“) wurde mit einer Pipette abgezogen. Die Zellwandtrümmer, die im Fall der Verwendung des Disintegrators auf den Glasperlen lagen, wurden unter mehrmaligem Wechsel der Lösung mit PBS-Puffer gewaschen und durch Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min) sedimentiert (Sediment entspr. „Zellwandfraktion“).

3.14.2 Nachweis physiologischer Substratproteine durch enzymatischen Einbau von Fluoreszenz- oder biotinylierten Markern sowie Polymerisation

Physiologische Substratproteine wurden zum einen durch den TGase-katalysierten Einbau von 1-N-(Carbobenzoxy-L-glutaminyglycyl)-5-N-(5'-N',N'-dimethylaminonaphthalin sulfonyl)diamidopentan (ZQGD) oder 1-N-Biotinyl-6-N-(carbobenzoxy-L-glutaminyglycyl) diamidohexan (ZQGB) als Lysinäquivalente, von 5-N-(5'-N',N'-dimethylaminonaphthalin sulfonyl)amidopentylamin (Monodansylcadaverin, MDC) oder 5-N-Biotinylamidopentylamin (Monobiotinylcadaverin, MBC) als Glutaminäquivalente identifiziert. Zum anderen wurden die Substrateigenschaften markierbarer Proteine durch zeitabhängige Polymerisationsversuche weiter charakterisiert. Bei der Markierung mit MBC oder ZQGB wurden die Proteine nach der Markierungsreaktion elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit Hilfe eines Konjugats aus Streptavidin und

alkalischer Phosphatase, das an die biotinylierten Proteine bindet, durch einen präzipitierenden Farbstoff nachgewiesen. Bei der Markierung mit den fluoreszierenden Farbstoffen ZQGD oder MDC erfolgten ebenfalls eine SDS-PAGE und danach eine Visualisierung unter UV-Licht bei 365 nm. Die wie in Abschnitt 3.14.1 gewonnenen Fraktionen Kulturüberstand und Zellwand wurden in Markierungsexperimenten mit ZQGD charakterisiert. Mit dem Kulturüberstand wurden zusätzlich Markierungsexperimente mit ZQGB, MBC und MDC durchgeführt. Nach der Polymerisationsreaktion wurden die Proteine elektrophoretisch getrennt und die Polymere mittels Silberfärbung und Western Blot-Analyse nachgewiesen.

30 mM	MBC
in 50 mM Tris-HCl pH 7,0	
4 mM	ZQGB
10% (v/v)	DMSO
in 50 mM Tris-HCl pH 7,0	
22 mM	MDC
2,65% (v/v)	1 M HCl
15%	0,1 M Tris-HCl pH 7,0
in A. bidest.	
4 mM	ZQGD
10% (v/v)	DMSO
in 0,01 M HCl	

Für 100 mg Zellwandpräparation wurde folgender Markierungsansatz verwendet:

30 µl	4 mM ZQGD
30 µl	TGase (ca. 3 U/ml)
200 µl	PBS-Puffer

Der Einbau von ZQGD in die Substratproteine erfolgte durch die zugesetzte TGase von *S. mobaraensis* mind. 2 h oder über Nacht (ÜN) bei 37 °C. Anschließend wurde die markierte Zellwand wie in Abschnitt 3.14.3 weiterbehandelt.

Markierungsansätze von Proteinlösungen (Kulturüberstand, teilgereinigte und gereinigte Proteine) mit einem Gesamtvolumen von 30 µl hatten üblicherweise die nachstehende Zusammensetzung:

0,1 M	HEPES pH 7,5
125 µM	CBZ-Gln-Gly-DAH-Biotin oder
2 mM	Monobiotinylcadaverin
	CBZ-Gln-Gly-CDNS
	Monodansylcadaverin
27,5 mU	TGase (11 U/ml)
4 – 6 µg	Protein

Der Einbau des jeweiligen Markers erfolgte ebenfalls mind. 2 h bei 37 °C oder üN. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne TGase und ohne Protein mitgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µl Auftragspuffer und Erhitzen für 5 min bei 90 °C abgebrochen, und die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese getrennt.

Fluoreszenzmarkierte Proteine wurden direkt nach der SDS-PAGE unter UV-Licht der Wellenlänge 365 nm photographisch dokumentiert, und anschließend wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben silbergefärbt. Der Nachweis von biotinylierten Proteinen erfolgte nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (3.9.4) wie in Tab. 3.18 beschrieben. Die Lösungen waren, wie in Abschnitt 3.9.5 beschrieben, zusammengesetzt.

Tab. 3.18: Verfahren zur Anfärbung von biotinylierten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.

Schritt	Lösung	Zeit
Waschen	TBST-Puffer	3 x 5 min
Sättigen	TBST-Blotto	min. 60 min
Waschen	TBST-Puffer	3 x 5 min
Streptavidinbindung	Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat	90 min
Waschen	TBST-Puffer	3 x 5 min
Äquilibrieren	Äquilibrierpuffer/Färbepuffer	1 min
Farbreaktion	Substratlösung	bis zur gewünschten Bandenintensität
Stoppen	Stopppuffer	1 min
Waschen	A. dest.	1 min

Streptavidinlösung: 140 µl Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (10 µg/ml)
30 ml TBST

Im Anschluss wurde die Membran dokumentiert und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Polymerisationsansätze von Proteinlösungen hatte ebenfalls ein Gesamtvolumen von 30 µl und es wurden die für die Markierung aufgeführten Reagenzien mit Ausnahme der Marker verwendet. TGase wurde in einem molaren Verhältnis von 1:10 zum zu untersuchenden Protein eingesetzt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne TGase und ohne Protein mitgeführt. Die Inkubation erfolgte zeitabhängig von 0 – 8 h bei 37 °C und 1500 rpm im Thermomixer. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Ansätze 1:1 mit SDS-PAGE-Auftragspuffer gemischt und bei 90 °C für 5 min denaturiert. Im Anschluss folgte die SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit immunchemischer Färbung wie unter Punkt 3.9.5 beschrieben, falls Antikörper gegen die eingesetzten Proteine vorhanden waren.

3.14.3 Gewinnung eines fluoreszierenden Zellwandpolymers

Nach der Markierung der Zellwandfraktion mit ZQGD wurde diese wie folgt zur Gewinnung eines fluoreszierenden Zellwandpolymers weiterbehandelt:

Tab. 3.19: Schema zur Gewinnung eines fluoreszierenden Zellwandpolymers aus markierten Zellwandtrümmern von *S. mobaraensis*.

Schritt	Durchführung	Anzahl
Waschen der Zellenwand	Zugabe von DMSO und kräftiges Durchmischen bis zur Homogenität, anschließend Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min)	3 x 5 min
Waschen der Zellenwand	Zugabe von 50 mM Tris-HCl pH 7,0 und intensives Durchmischen bis zur Homogenität, anschließend Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min)	3 x 5 min
Lösen der Zellwand	Zugabe von TFA und Durchmischen bis zur Homogenität, Lösen im Ultraschallbad, anschließend Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min)	min. 30 min
Abdampfen der TFA	im Vakuum (20 mbar)	bis zur vollständigen Trocknung
Waschen des Zellwandpolymers	Zugabe von <i>A. bidest.</i> und Durchmischen, anschließend Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min)	3 x 5 min
Lösen des Zellwandpolymers	in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 2% N-Lauroylsarcosin, anschließend Zentrifugieren (10000 rpm, 10 min)	

3.14.4 Unterdrückung der Quervernetzung durch Transglutaminase mit Cadaverin

Die Inhibierung der Quervernetzung durch TGase mit Cadaverin wurde am Modellsubstrat Casein *in vitro* untersucht. Durch den Einbau von Cadaverin erhalten Glutaminreste eine freie Aminogruppe, und TGase kann keine Isopeptidbindung mit den Aminogruppen der Lysine mehr bilden. Die Proteine werden auf diese Weise nicht oder erheblich reduziert vernetzt. Außerdem ist der Einsatz von Cadaverin kostengünstig und macht die Proteine wasserlöslicher. Das kleine Molekül ist außerdem leicht mit den in Abschnitt 3.5 beschriebenen Methoden sowohl aus Kulturüberstand als auch aus *in vitro* TGase-Reaktionsansätzen zu entfernen. Casein wurde als Modellsubstrat gewählt, da es sich sowohl um ein gutes Lysin- als auch Glutaminsubstrat für TGase handelt und die Inhibitorwirkung von Cadaverin gut verfolgt werden kann. Im Anschluss an die Versuche mit Casein wurde die Unterdrückung der Quervernetzung durch TGase mit Cadaverin während des Wachstums von *S. mobaraensis* sowohl in Flüssig- als auch auf Agarmedium untersucht.

Die Ansätze zur Unterdrückung der Quervernetzung durch TGase von Casein mittels Cadaverin mit einem Gesamtvolumen von 40 µl hatten folgende Zusammensetzung:

0,1 M	Tris-HCl pH 7,0
625 µM – 12,5 mM	Cadaverin
30 mU	TGase (ca. 3 U/ml)
4 µg	Casein oder Dimethylcasein

Als Kontrollen dienten die jeweiligen Ansätze ohne Cadaverin, TGase oder Casein bzw. Dimethylcasein. Die Inkubation erfolgte bis zu 1 h bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µl Auftragspuffer und Erhitzen für 5 min bei 90°C abgebrochen, und die Mischung wurde mittels Gelelektrophorese getrennt und anschließend wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben silbergefärbt.

4. Ergebnisse

Bakterielle Transglutaminase von *S. mobaraensis* katalysiert die calciumunabhängige Vernetzung von Proteinen durch Verknüpfung von Glutamin- und Lysinresten unter Bildung von Isopeptidbindungen. Außerdem ist es eines der Hauptproteine, welches das Bakterium bei der Kultivierung in einem flüssigen Komplexmedium ausscheidet. Bei Wachstum auf Agar lässt sich das Enzym erst nach Einsetzen des Luftthyphenwachstums nachweisen (Zotzel 2002). Diese Beobachtungen und der morphologisch komplexe Lebenszyklus des multizellulären Organismus legen die Vermutung nahe, dass das Enzym eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung, vor allem bei der Bildung des Luftmycels, spielen könnte. Um die biologische Funktion der TGase ermitteln zu können, ist es notwendig, physiologische Substrate des Enzyms zu kennen. Ziel dieser Arbeit war es daher, diese zu identifizieren und zu charakterisieren. Erste Versuche dazu wurden bereits von Pasternack (1997, 1998) mit dansylierten TGase-Substraten unternommen. Die hier vorgenommenen orientierenden Markierungsversuche von Proteinen eines 3 – 4 d alten Kulturüberstandes mit sensitiverem 5-N-Biotinylamidopentylamin (Monobiotinylcadaverin, MBC) und 1-N-(carbobenzoxyl-L-glutaminyglycyl)-5-N-(5'-N',N'-dimethylaminonaphthalinsulfonyl)diamido pentan (ZQGD) blieben ebenfalls erfolglos. Frühere Untersuchungen zur Hydrolyse bzw. Deamidierung von ZQGD durch TGase hatten gezeigt, dass diese sehr langsam vonstatten geht (Pasternack et al. 1997). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Substratproteine bevorzugt im Flüssigmedium als unlösliche Polymere in die Zellwand eingebaut oder bei Abbruch der Kultivierung mit der Zellmasse abgetrennt werden. Diese Annahme wurde durch den Nachweis von mit MBC und ZQGD markierbaren Proteinen in einem Zellwandpolymer gestärkt (Pasternack 1998). Eine Inhibierung der sezernierten TGase während der Flüssigkultur sollte entsprechend die Vernetzung verhindern und damit eine Freisetzung der Substrate in größeren Mengen ermöglichen. Aus diesem Grund musste im Vorfeld eine Methode zur Unterdrückung der enzymatischen Polymerisation gefunden werden, um monomere Substratproteine durch Einsatz eines geeigneten TGase-Inhibitors während der Kultivierung zu gewinnen. Ein weiteres Vorhaben war die proteinchemische und enzymatische Charakterisierung der identifizierten Substratproteine. Die Untersuchungen sollten dazu beitragen, die Funktion der Proteine, aber auch der Transglutaminase besser zu verstehen.

4.1 Unterdrückung der enzymatischen Proteinvernetzung mit Cadaverin

4.1.1 Untersuchungen am Modellsubstrat α_{S1} -Casein

Für die Unterdrückung der Quervernetzung durch TGase wurde Cadaverin benutzt, da es über seine beiden freien Aminogruppen in reaktive Seitenketten der Glutaminresten von Substratproteinen unter Bildung von Amidbindungen eingebaut werden kann. Dadurch erhalten reaktive Glutamine eine freie Aminogruppe und die Polymerisation wird weitgehend unterdrückt. Nur eine Vernetzung mit einem weiteren Glutamin über das Cadaverinbindeglied sollte in vermindertem Maße möglich sein. Ein großer Vorteil des Inhibitors ist, dass sein Einbau weitere primäre Aminogruppen generiert, die durch die gemeinsame Markierung mit reaktiven Lysinseitenketten die Identifizierung eines Substratmoleküls erleichtern. Mit nur einem Marker (ZQGD oder ZQGB) lassen sich so gleichzeitig Glutamin- und Lysindonorproteine ermitteln. Die Vorversuche zur Bestimmung der Cadaverinkonzentration, die zur Inhibierung der Polymerisation von Substratproteinen mit TGase mindestens nötig ist, wurden mit dem Modellsubstrat α_{S1} -Casein durchgeführt. Das Milchprotein ist ein gutes Glutamin- und Lysinsubstrat von allen bekannten TGasen. Zuerst wurde die Abhängigkeit der Inhibierung der Polymerisation von der Cadaverinkonzentration untersucht. Dazu wurden 20 μg α_{S1} -Casein und 0,625 bis 12,5 mM Cadaverin in Gegenwart von 30 mU TGase 1 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Cadaverin. Das silbergefärbte Polyacrylamid-Gel belegte, dass Cadaverin bereits in einer Konzentration von 625 μM die Vernetzung von α_{S1} -Casein fast vollständig unterdrückt. Dagegen war im Kontrollansatz ohne Inhibitor α_{S1} -Casein vollständig polymerisiert. Für die anschließende Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Reaktion mit 625 μM Cadaverin wurde das Substratprotein im Ansatz auf 4 μg gesenkt, sodass ein 190-facher molarer Überschuss des Inhibitors vorlag. Die Inkubation erfolgte zwischen 0 und 10 min bei 37°C, da bereits 10 min ausreichten, um α_{S1} -Casein mit 30 mU TGase vollständig in Oligomere und hochmolekulare Polymere umzusetzen (Abb. 4.1). Der Einbau von Cadaverin in α_{S1} -Casein mit TGase war ebenfalls bereits nach 10 Minuten abgeschlossen. Auf dem Elektrophoresegel zeigte sich eine leichte Verschiebung sowohl der Hauptproteinbande von ca. 30 kDa als auch einer Verunreinigung bei ca. 70 kDa zu niedrigeren apparenten Molmassen. Die Quervernetzung wurde dabei weitgehend unterdrückt, wie bei den Spuren 3 – 7 am Einlauf zum Trenngel zu erkennen ist.

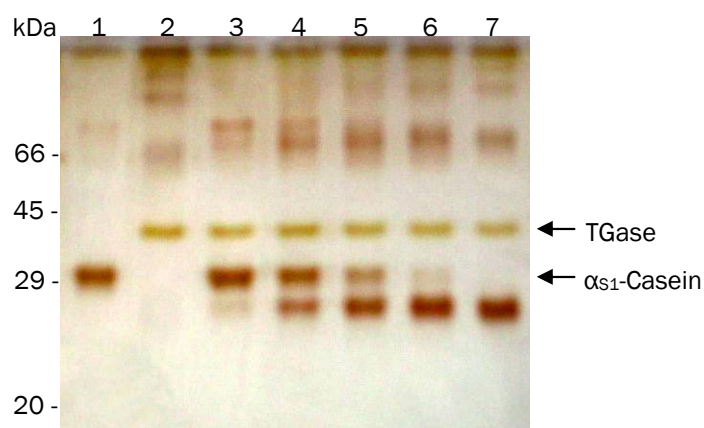


Abb. 4.1: Untersuchungen zur Inhibierung der Quervernetzung von α_{s1} -Casein durch TGase mittels Cadaverin. 4 μ g α_{s1} -Casein wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 mit 0 und 625 μ M Cadaverin und 30 mU TGase zwischen 0 und 10 min bei 37 °C inkubiert. Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel Spur 1: α_{s1} -Casein; Spur 2: α_{s1} -Casein + TGase, 10 ' Inkubation; Spur 3 – 7: α_{s1} -Casein + TGase + 625 μ M Cadaverin, 0 ' ; 1 ' ; 2 ' ; 5 ' und 10 ' Inkubation.

4.1.2 Untersuchungen zum Nachweis von Transglutaminase-Substraten in Agar- und Flüssigmedium

Aufgrund der erfolgreichen Unterdrückung der Quervernetzung von α_{s1} -Casein durch TGase mit Cadaverin wurde dieses anschließend bei der Kultivierung von *S. mobaraensis* sowohl auf Agar- als auch in Flüssigmedium eingesetzt, um monomere Substratproteine zu erhalten. Ein Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffes zum Kulturmedium und somit die direkte Markierung der gesuchten Proteine während des Wachstums war nicht möglich, weil ZQGD eine sehr teure Verbindung ist, die zudem vom Bakterium hydrolysiert werden kann. Da erwartet wurde, dass das Bakterium Cadaverin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle oder als Polyaminbaustein nutzen könnte, wurde eine höhere Konzentration des Diamins als in den Vorversuchen mit Casein gewählt, um einen sicheren Einbau in die Substratproteine durch die gleichzeitig exportierte TGase zu gewährleisten. Dabei sollte auch die Wirkung des Inhibitors auf das bakterielle Wachstum untersucht werden, um ggf. Hinweise auf die Funktion von TGase zu erhalten.

Zuerst wurden Oberflächenkulturen auf Minimalmedium (GYM-Medium) mit 0,1% Cadaverin angelegt. Animpfen mit Sporensuspension und Inkubation der Agarplatten erfolgte wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben bei 28 °C. Cadaverinkulturen wuchsen im Vergleich zur Kontrolle langsamer und wiesen morphologische Veränderungen auf. Im Besonderen war die Bildung der Luftmycelien gehemmt (Abb. 4.2, Abb. 4.3). Diese konnten sich in vielen Fällen nur an den äußeren Rändern der Kolonien entwickeln, während das Zentrum wie bei *bld*-Mutanten eine nackte Oberfläche zeigte.

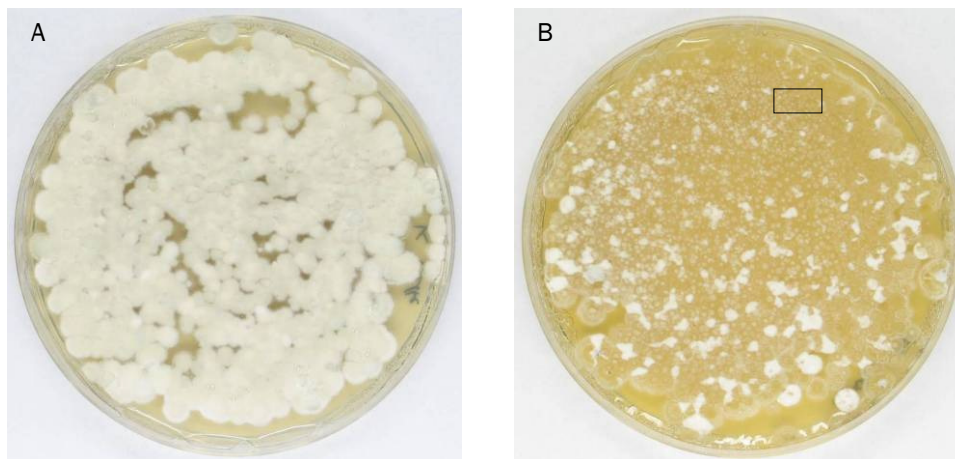


Abb. 4.2: 10 Tage alte Oberflächenkulturen von *S. mobaraensis* auf GYM-Agar. (A) Kontrolle ohne Cadaverin. Kolonien mit weißem Luftmycel sind klar erkennbar. (B) Kultur mit 0,1% Cadaverin. Großflächig fehlt das Luftmycel. Der markierte Bereich ist in Abb. 4.3 herausgehoben.

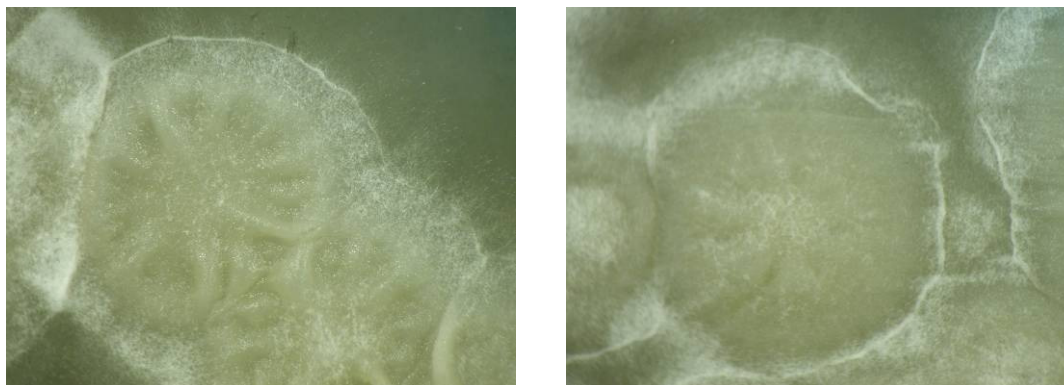


Abb. 4.3: *S. mobaraensis*-Kolonien auf GYM-Agar mit 0,1% Cadaverin (Vergrößerung des in Abb. 4.2 B markierten Bereichs). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kolonien kein oder nur stellenweise Luftmycel ausgebildet haben. Wurde dieses gebildet, dann vorwiegend an den äußeren Rändern einer Kolonie.

Aus den Ergebnissen der Oberflächenkulturen wurde geschlossen, dass Cadaverin direkt die Ausbildung des Luftmycels beeinflusst, indem es wahrscheinlich in TGase-Substrate eingebaut wird, die danach nicht mehr als Bausteine der bakteriellen Zellwand fungieren können.

Als nächster Schritt wurde Cadaverin in Flüssigkulturen eingesetzt, um die gesuchten Proteine in hoher Konzentration herzustellen. Da bereits bei den Oberflächenkulturen Auswirkungen des Cadaverins auf das Wachstum festgestellt werden konnten, wurde zunächst die letale Konzentration bestimmt. Dazu wurden dem Medium 0,1% und 1% Cadaverin vor dem Animpfen zugesetzt, wobei der Kontrollansatz keinen Inhibitor enthielt. Die Inkubation erfolgte in 1-l-Schikanekolben auf einem Querschüttler bei 28°C wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Probennahmen erfolgten nach 7, 24, 31, 48, 55 und 72 h. Bereits bei 0,1% Cadaverin im Medium war das Wachstum gegenüber der Kontrolle deutlich eingeschränkt. Die im Flüssigmedium typischerweise auftretenden

kugelförmigen Mycelien (Zotzel 2002) waren wesentlich kleiner. Bei einer Konzentration von 1% fand kein Wachstum mehr statt. Proteine wurden erstmals nach 48 h mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass offensichtlich gleiche Proteine im Bereich von 14 – 20 kDa durch den Einfluss des Inhibitors zu einer langsameren Wanderungsgeschwindigkeit bewegt werden, was beim Abbruch der Kultivierung nach 72 h kaum noch erkennbar ist (Abb. 4.4).

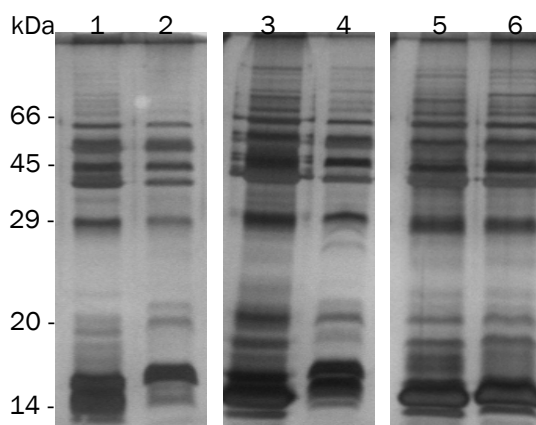


Abb. 4.4: Untersuchungen zur Kultivierung von *S. mobaraensis* ohne und mit 0,1% Cadaverin im Flüssigmedium. Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel des zu verschiedenen Zeiten geernteten Kulturüberstandes (KÜ). Spur 1, 3 und 5: KÜ der Kontrolle nach 48 h, 55 h und 72 h; Spur 2, 4 und 6: KÜ des 0,1% Cadaverin enthaltenden Mediums nach 48 h, 55 h und 72 h. Es ist deutlich die Molekulargewichtsverschiebung der Proteine des cadaverinhaltigen Mediums zu einer höheren apparenten Molmasse zu erkennen.

Aufgrund der Toxizität von 1% Cadaverin auf *S. mobaraensis* wurden zusätzlich Konzentrationen von 0,01%, 0,05% und 0,2% im Flüssigmedium getestet, um die einsetzbare Obergrenze des Inhibitors zu bestimmen. Als Kontrollansätze dienten jeweils ohne und mit 0,1% Cadaverin angezogene Kulturen. Bei 0,01% Cadaverin im Medium zeigte sich keine Veränderung im Wachstum verglichen mit der Kontrolle ohne Inhibitor. Die Kulturen mit 0,05% und 0,1% Cadaverin wuchsen eingeschränkt in Form kleinerer Mycelien, wobei es bei letzterer zusätzlich zu einer zeitlichen Wachstumsverzögerung kam. Bei einer Konzentration von 0,2% Inhibitor fand kein Wachstum mehr statt. Die Untersuchung der zellfreien Kulturüberstände mittels SDS-PAGE ergab bei den mit 0,05% und 0,1% Cadaverin angezogenen Kulturen, verglichen mit der Kontrolle ohne Cadaverin, die bereits beobachtete langsamere Wanderungsgeschwindigkeit offensichtlich gleicher niedermolekularer sekretierter Proteine. Im 0,01% Cadaverin enthaltenden Kulturüberstand wurde keine Veränderung des Proteinmusters festgestellt. Die Toxizitätsgrenze lag somit zwischen 0,1% und 0,2% Cadaverin.

Die Angleichung der Proteinmuster von cadaverinhaltigen Kulturüberständen und Kontrollen nach einer bestimmten Kultivierungszeit legte nahe, dass das Diamin vom Bakterium verbraucht wird und damit seine Wirkung auf TGase verliert. In einem nächsten Schritt wurde der Inhibitor deshalb alle 24 h dem Medium zugefügt. Bei den zellfreien Kulturüberständen mit 0,01% und 0,05% Inhibitor konnten keine wesentlichen Unterschiede im Proteinmuster zur Kontrolle festgestellt werden. Bei regelmäßiger Zugabe von dreimal 0,1% Cadaverin innerhalb von 3 d fand kein Wachstum statt, sodass erst nach dem Anwachsen von *S. mobaraensis* ohne Inhibitor nach 24 h noch zweimal 0,1% Cadaverin hinzugefügt wurde. Die sezernierten Proteine dieser Kultur entsprachen dem früheren Versuch, bei dem Cadaverin bereits vor dem Animpfen im Medium vorlag. Zur Feststellung der Substrateigenschaften von Proteinen wurden mit den zellfreien Kulturüberständen Markierungsversuche mit ZQGD, wie in Abschnitt 3.14.2 beschrieben, durchgeführt. Dabei konnten keine fluoreszierenden Banden im Polyacrylamid-Gel detektiert werden. Auch die vorherige Entfernung von Cadaverin, welches die Markierungsreaktion möglicherweise stören könnte, durch fraktionierende Ethanolfällung von 10 – 80 Vol% (Methode 3.5.1) oder Dialyse (Methode 3.5.4) führte nicht zum Nachweis fluoreszierender Proteine.

TGase wird während der Kultivierung von *S. mobaraensis* durch die Metalloprotease TAMEP aktiviert, die aller Wahrscheinlichkeit nach im Aktivzentrum ein Zinkion gebunden hat. Nachfolgend wurde deshalb untersucht, ob die Aktivierung von TGase und damit eine Modifizierung von Substratproteinen durch ein Nährmedium ohne Spurenelemente, insbesondere ohne Zink, verhindert werden kann. Zusätzlich wurde der Einfluss vom pH des Mediums auf die Vernetzungsaktivität der TGase von *S. mobaraensis* im Bereich von 4,0 – 8,5 in Abständen von 0,5 pH-Einheiten untersucht. Keine der beiden Versuchsreihen lieferte Kulturüberstände mit markierbaren Proteinen. Interessanterweise zeigte sich aber, dass *S. mobaraensis* innerhalb von 24 bis 48 h einen pH von 6 – 7 einstellt. Offensichtlich verfügt das Bakterium über ausgezeichnete Regulationsmechanismen, um bessere äußere Wachstumsbedingungen herzustellen. Wahrscheinlich reichen auch die über die komplexen Nährstoffe ins Medium eingebrachten Metalle für eine Aktivierung von TGase aus.

Da durch Kultivierung im Flüssigmedium keine TGase-Substrate gewonnen werden konnten, wurde abschließend versucht, markierbare Proteine aus dem Agarmedium von Oberflächenkulturen durch Absaugen der Flüssigkeit mit einem Büchner-Trichter i. Vak. zu erhalten. Die Experimente wurden mit 10 d alten Kulturen durchgeführt, deren

Medium 0,1% Cadaverin enthielt. Auch dieser Versuch brachte nicht den gewünschten Erfolg.

4.2 Untersuchungen zum Nachweis von Transglutaminase-Substraten in der Zellwand

Da sich im Kulturüberstand von *S. mobaraensis* keine monomeren TGase-Substrate nachweisen ließen, sollten Substrate, ggf. auch in polymerisierter Form, in einem nächsten Schritt aus der Zellwand isoliert werden.

Dazu wurde *S. mobaraensis* im Flüssigmedium ohne Cadaverin für 48 h, mit 0,1% Cadaverin für 72 h, und auf Agarmedium ohne und mit 0,1% Cadaverin für 10 d angezogen. Nach mehrmaligem Waschen der isolierten Zellen mit PBS wurden lösliche und ionisch gebundene Proteine mit 1 M NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 entfernt. Sowohl die Extrakte als auch deren Dialysate enthielten keine mit ZQGD markierbaren Proteine. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Disintegrator oder Mörser bei 4°C aufgeschlossen, und die mehrmals mit PBS gewaschene Zellwandfraktion (ZWF) mit ZQGD markiert. Anschließendes Extrahieren der ZWF bei 90°C mit SDS-Auftragspuffer oder SDS-Auftragspuffer mit 20% Mercaptoethanol führte zur Freisetzung verschiedener Proteine bzw. eines Polymerkontinuums, die jedoch nach elektrophoretischer Trennung keine Fluoreszenz zeigten. Nur das im Überschuss vorhandene ZQGD war am Auslauf sichtbar, und die extrahierte ZWF fluoreszierte weiterhin. Der überschüssige Farbstoff wurde deshalb bei weiteren Versuchen nach der Markierung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) entfernt, und die ZWF zur Entfernung von DMSO mit 50 mM Tris-HCl pH 7,0 gewaschen. Der nachfolgende Verdau von 50 mg feuchten ZWF-Aliquots mit jeweils 500 µg Lysozym, α-Chymotrypsin, Dispase, Proteinase K oder Trypsin (jeweils 1 mg/ml) in geeignetem Puffer für bis zu 5 h bei 37°C führte nur bei Lysozym und in sehr geringem Maße bei Proteinase K zur Freisetzung von Proteinen aus der ZWF, die aber nicht fluoreszierten. Eine Extraktion der ZWF nach dem Lysozymverdau mit SDS-Auftragspuffer oder Mercaptoethanol-haltigem SDS-Auftragspuffer zeigte nur ein schwach fluoreszierendes Polymer am Einlauf des Polyacrylamid-Trenngels.

Im nächsten Schritt erfolgte die Hydrolyse der DMSO-extrahierten, fluoreszierenden ZWF mit Trifluoressigsäure (TFA), die, ohne Proteine anzugreifen, die Peptidoglycanschicht durch Öffnen der glycosidischen Bindungen zerstört. Nach Abtrennen der in TFA unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurde TFA i. Vak. bei 20 mbar entfernt, wodurch bei allen untersuchten Proben ein in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 unlöslicher,

fluoreszierender Rückstand übrig blieb. Da auch die Proteinrückstände der ohne Cadaverin angezogenen Kulturen (Kontrollen) fluoreszierten, wurde ausschließlich mit diesen weitergearbeitet, um nicht-modifizierte Proteine der ZWF zu erhalten.

Der Verdau von 50 mg des Proteinrückstandes mit 4,5 µg Trypsin (15 µg/ml) bei pH 7,5 für bis zu 2 h bei 37 °C führte nicht zur Solubilisierung markierter Proteine oder Proteinfragmente für eine Sequenzanalyse. Weitere Lösungsversuche wurden mit 2% SDS, 8 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumchlorid und den Detergenzien Tween 20, Tween 80, Triton X 100 (jeweils 0,1% und 1%), N-Lauroylsarcosin (LS), CHAPS (jeweils 2%), Dodecyl- β -D-maltosid und n-Octyl- β -D-glucopyranosid (jeweils 0,2%) bei Temperaturen bis zu 80 °C durchgeführt. Nur in SDS- und LS-haltigem Puffer war das Polymer löslich. Der beste Lösungsvermittler war die Lipoamino-säure LS, die das Polymer bereits bei Zimmertemperatur in Lösung hielt, während die Verwendung von SDS eine 30 min Erhitzung auf 90 °C erforderte. Das Elektrophoresegel zeigte fluoreszierende Proteinpolymere am Einlauf von Trenn- und Sammelgel (Abb. 4.5).

Zur Reinigung der Polymere und Entfernung von LS wurde eine fraktionierende Ethanolfällung zwischen 10 und 80 Vol% durchgeführt, da vorangegangene Versuche mit Größenausschluss- und Ionenaustauschchromatographie erfolglos blieben. Es konnte gezeigt werden, dass das fluoreszierende Polymer zwischen 40 und 50 Vol% Ethanol ausfällt. Dadurch erfolgte auch eine Aufkonzentrierung des Polymers, und die Löslichkeit wurde soweit verbessert, dass kein Zusatz von LS mehr notwendig war. Im Elektrophoresegel zeigten sich allerdings keine distinkten Banden, sondern ein fluoreszierendes Proteinkontinuum vom Einlauf ins Trenngel bis zur Lauffront (Abb. 4.5, Spuren 5 und 6).

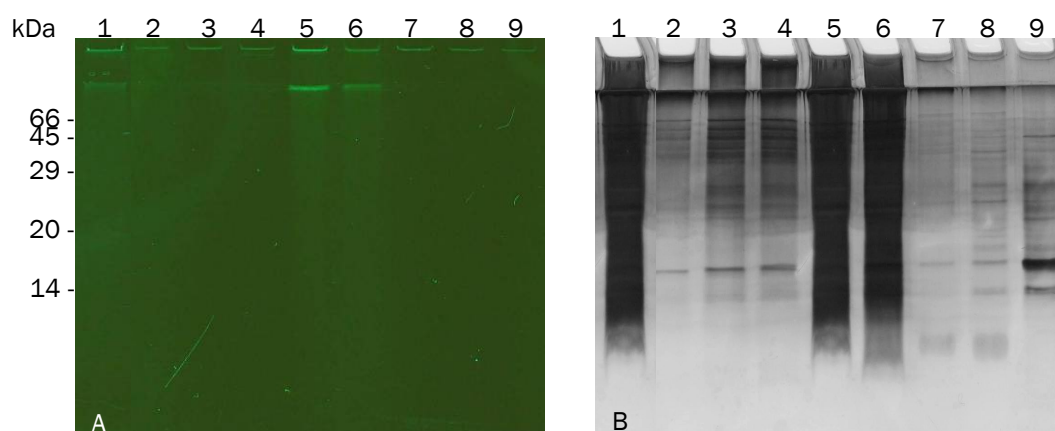


Abb. 4.5: Reinigung eines fluoreszenzmarkierten Zellwandpolymers von *S. mobaraensis* durch Ethanolfällung. (A) Bei 365 nm angeregtes und (B) silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. Spur 1: nach Auflösung der bakteriellen Zellwand mit TFA gewonnenes, in 50 mM Tris-HCl/2% (w/v) N-Lauroylsarcosin pH 7,0 gelöstes, fluoreszenzmarkiertes Polymer; Spuren 2 – 9: Präzipitate nach Zugabe von 10 – 80 Vol% Ethanol.

Zur weiteren Aufreinigung des nun ohne LS löslichen Polymers erfolgte erneut eine Ionenaustauschchromatographie. Der Versuch blieb erneut ohne Erfolg. Ein Teil des fluoreszierenden Polymers befand sich im Vorlauf, während ein anderer Teil erst bei der Regeneration mit 0,2 M NaOH von der Säule gewaschen wurde. Mit NaCl konnte kein fluoreszierendes Protein eluiert werden. Weitere Aufreinigungsversuche mit GPC scheiterten ebenfalls. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass keine monomeren TGase-Substrate in isolierbaren Mengen im fluoreszierenden Zellwandpolymer vorhanden waren.

Um für eine Proteinsequenzierung kleinere Fragmente zu erhalten, wurden Untersuchungen zum Verdau der polymeren TGase-Substrate durch verschiedene Proteasen bei pH 6,5 (Cysteinproteasen) und pH 7,5 (übrige Proteasen) durchgeführt. Verwendet wurden Papain, Bromelain, Trypsin, α -Chymotrypsin, Dispase, Proteinase K, Thermolysin und Subtilisin in einer Konzentration von je 1 mg/ml in 0,1 M Natriumcitrat pH 6,5 bzw. 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl_2 pH 7,5. Proben wurden nach 0, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten genommen, um die Fragmentbildung durch SDS-PAGE zu ermitteln. Mit allen Proteasen erfolgte der Abbau des Polymers, jedoch wurde kein sequenzierfähiges Fragment gebildet.

Deshalb wurde zum Erhalt von Sequenzinformation das fluoreszierende Polymer durch MALDI-TOF-MS analysiert. Vier Proben wurden dem durch SDS-PAGE aufgetrennten Polymer entnommen, wovon nur für drei auswertbare MS/MS Daten erhalten wurden. Identifiziert wurden ausschließlich intrazelluläre und Membranproteine, wie ein Sequenzvergleich der massenspektrometrischen Teilsequenzen über den MASCOT Suchalgorithmus in der NCBI-nr-Datenbank zeigte. MASCOT erlaubt die Suche nach tryptisch abgebauten Proteinen über das entsprechende Peptidfragmentmuster. Zahlreiche der erhaltenen Peptide konnten keinem Protein zugeordnet werden (wie später noch gezeigt wird, sind die Sequenzen der TGase-Substrate überwiegend nicht in Datenbanken vorhanden).

Das Polymer wurde außerdem zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet, um monomere Substratproteine von Flüssig- und Oberflächenkulturen durch Western Blot-Analyse identifizieren zu können.

4.3 Untersuchungen zum Nachweis von Transglutaminase-Substraten mit Antikörpern gegen das Zellwandpolymer

Polyklonale Antikörpern (AK) gegen das Zellwandpolymer wurden durch Immunisierung eines Kaninchens hergestellt und standardmäßig von anderen Serumproteinen über Affinitätschromatographie gereinigt. Bei AK-Verdünnungen von 1:4000 und 1:64000 waren noch 25 bzw. 200 µg des Zellwandpolymers im Dot Blot nachweisbar. Mit den gereinigten Antikörpern wurde erneut nach monomeren Substratproteinen von TGase in Kulturüberständen (KÜ) gesucht. Der hohe Titer versprach die Identifizierung selbst kleinster Mengen eines Substratproteins. Die KÜ stammten von Kontrollen (K) und mit verschiedenen Konzentrationen an Cadaverin (Cad) angezogenen *S. mobaraensis* Flüssigkulturen unterschiedlichen Alters. Weiterhin wurden NaCl-Auszüge der verschiedenen Zellmassen verwendet.

In Voruntersuchungen lieferten Dot Blots erste Informationen über die Antigenität der Proteine. Proben mit deutlichen Signalen wurden ausgewählt, um zusätzlich eine Western Blot-Analyse durchzuführen. Dabei wurde festgestellt, dass 48 – 72 h alte Kulturüberstände von *S. mobaraensis* mit verschiedenen Cadaverinkonzentrationen, nicht aber die 72 h alte Kontrolle, bei ca. 21 kDa eine breite distinkte Bande zeigten, die allerdings mit AgNO₃ nicht anfärbbar war (Abb. 4.6). Gut erkennbar ist jedoch ein heller („ausgesparter“) Bereich im silbergefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel, der mit den Banden des Western Blots korrespondiert.

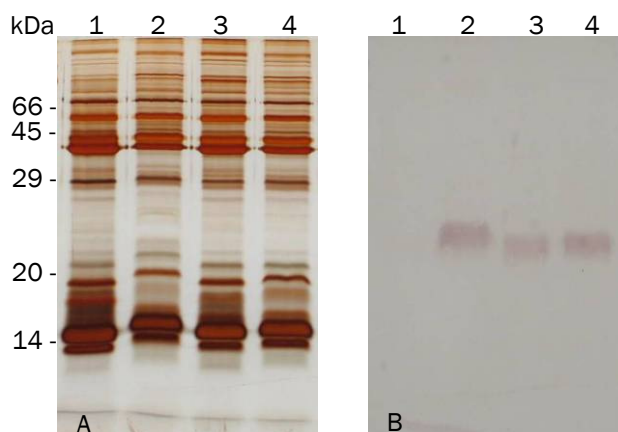


Abb. 4.6: Western Blot-Analyse von Kulturüberständen von *S. mobaraensis* zur Identifizierung von TGase-Substraten. (A) Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Immunchemisch, nach Inkubation mit polyklonalen AK gegen ein mit TGase markiertes Zellwandpolymer, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1: KÜ K 72 h; Spur 2: KÜ 0,1% Cad 72 h; Spur 3: KÜ 0,01% Cad 72 h; Spur 4: KÜ 0,075% Cad 48 h.

Zur Anreicherung des identifizierten Proteins wurde eine fraktionierende Ethanolfällung durchgeführt. Dafür wurden KÜ von 48 h alten Kulturen verwendet, da das gesuchte Protein nach dieser Kultivierungszeit bereits detektiert werden konnte (Abb. 4.6, Spur 4). In Abb. 4.7 sind die Ethanolpräzipitate eines KÜ ohne Cadaverin im Nährmedium dargestellt. Die Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und wie zuvor angefärbt. Der Western Blot zeigte, dass das Protein nach 48 h Kultivierungszeit auch im KÜ der Kontrolle enthalten ist und bei 30 – 40 Vol% Ethanol ausfällt, wobei kleinere Mengen noch bei höherem Ethanolgehalt (50 – 60 Vol%) ausfallen. Die Analyse der Präzipitate des KÜ mit 0,1% Cad im Nährmedium zeigte ein ähnliches Ergebnis, wobei das Signal bei ca. 21 kDa stärker war (nicht dargestellt). Auch nach der Konzentrierung waren bei diesem Protein weder Silber- noch Coomassiefärbung möglich. Andere Proteine, die nicht mit Silberionen anfärbbar sind, sind seit langem beschrieben (Schleicher & Watterson 1983). Es war deshalb davon auszugehen, dass das antigene Protein dieser Kategorie zuzuordnen ist.

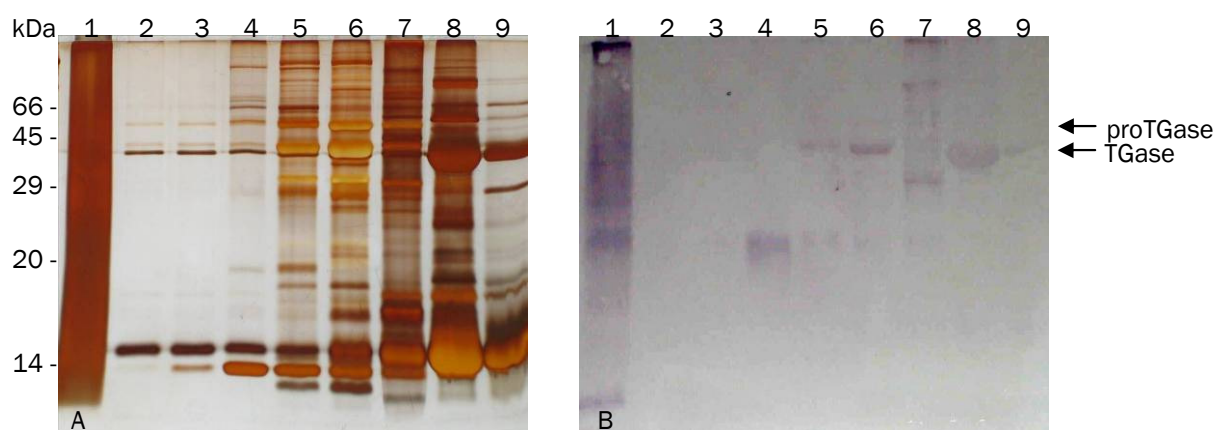


Abb. 4.7: Western Blot-Analyse der Präzipitate eines 48 h alten Kulturüberstandes von *S. mobaraensis* ohne Cadaverin im Medium (Kontrolle) nach Zugabe von 10 – 80 Vol% Ethanol. (A) Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Immunchemisch, nach Inkubation mit polyklonalen AK gegen ein mit TGase markiertes Zellwandpolymer, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1: fluoreszenzmarkiertes Zellwandpolymer; Spuren 2 – 9: 10 – 80 Vol% Ethanolpräzipitate.

Interessanterweise identifizierten die Antikörper weitere Proteine des Kulturüberstandes. TGase fällt typischerweise bei 40 – 50 Vol% Ethanol und ist deutlich als dicke hellbraune Bande bei 38 kDa (reifes Enzym) bzw. 45 kDa (Zymogen) im silbergefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel zu erkennen (Abb. 4.7, Spuren 4 und 5). Offensichtlich wird das Enzym von den ZWP-AK erkannt, was für einen kovalenten Selbsteinbau des sehr gut löslichen Proteins in die Zellwand spricht. Bei 60 Vol% Ethanol fallen Proteine aus, die drei kreuzreaktive Banden bei ca. 29 kDa, ca. 75 kDa und am Einlauf zum Trenngel erzeugen. Auch diese dürften noch als Abbauprodukt (das primäre Fragment von TGase hat eine

apparente Molmasse von 29 kDa), Dimer bzw. höhere Aggregate von TGase stammen. Bei der ca. 37 kDa großen Bande, die jeweils im 70 Vol% und 80 Vol% Präzipitat gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, dass es sich um das Dispase-Autolyse induzierende Protein (DAIP) handelt, welches in der AG Fuchsbauer entdeckt wurde (Sarafeddinov & Fuchsbauer, persönliche Mitteilung). Auch hier findet man im silbergefärbten Gel eine dicke Bande auf der Höhe des kreuzreaktiven Proteins, die in Abb. 4.7A (Spur 8) an ihrer rot-braunen Färbung zu erkennen ist.

Da im KÜ mit 0,1% Cad ein höherer Anteil eines ca. 21 kDa großen Proteins enthalten war, wurde dieser für Versuche zu dessen Anreicherung verwendet. Um nachzuweisen, ob es sich bei dem Protein um ein TGase-Substrat handelt, wurde eine erneute Fluoreszenzmarkierung mit ZQGD durchgeführt. Dabei zeigte die immunchemische Färbung der Nitrocellulosemembran nach Inkubation mit ZWP-AK eine zweite distinkte Bande bei ca. 14 kDa, bei der es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nur um den 14 kDa großen *Streptomyces* Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor (SSTI) oder den 12 kDa großen *Streptomyces* Papain Inhibitor (SPI) handeln konnte. SPI wurde ebenfalls in der AG Fuchsbauer identifiziert (Sarafeddinov & Fuchsbauer, persönliche Mitteilung). Da keine Fluoreszenz im Gel erkennbar war, war offensichtlich die höhere Sensitivität der ZWP-Antikörper ausschlaggebend für die Detektion des Proteins (Abb. 4.8). Wahrscheinlich waren im verwendeten Antiserum neben den ZWP-AK Immunglobuline gegen den eingebauten Farbstoff (das zur Immunisierung verwendete Zellwandpolymer war enzymatisch dansyliert), aber keine gegen das monomere Substratprotein vorhanden, ansonsten wäre bereits die Proteinbande ohne vorherige Dansylierung angefärbt worden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Bezug auf die 14 kDa Bande bei späteren Untersuchungen mit KÜ ohne Cadaverin, sodass für die Reinigung der vermuteten TGase-Substrate Kulturüberstand ohne Inhibitor verwendet wurde.

Die Ergebnisse mit den ZWP-AK lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass erstmals distinkte Substratproteinbanden mit den apparenten Molmassen von 12 kDa oder 14 kDa, 29 kDa, 37 kDa, 38 kDa und 75 kDa erhalten wurden.

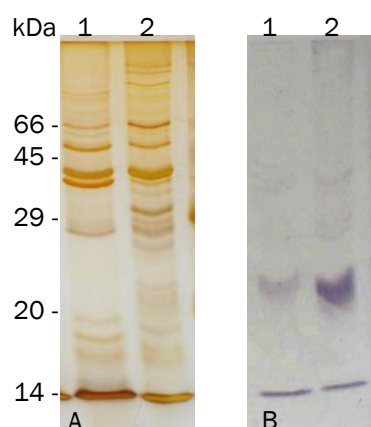


Abb. 4.8: Western Blot-Analyse eines 48 h alten Kulturüberstandes von *S. mobaraensis* mit 0,1% Cadaverin im Medium und dessen 30 – 40 Vol% Ethanolpräzipitat nach Markierung mit ZQGD durch TGase. Die Markierungen mit 2 mM ZQGD erfolgten in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 durch 27,5 mU TGase für 2 h bei 37 °C. (A) Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Immunchemisch, nach Inkubation mit polyklonalen AK gegen ein mit TGase markiertes Zellwandpolymer, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1: KÜ 0,1% Cad; Spur 2: 30 – 40 Vol% Ethanolpräzipitat des KÜ 0,1% Cad.

4.4 Screening nach weiteren Transglutaminase-Substraten

Für ein abschließendes Screening und alle weiteren Markierungsexperimente wurden nun biotinylierte Marker (ZQGB, MBC) wegen ihrer höheren Empfindlichkeit verwendet. Damit wurden die bereits oben beschriebenen Ethanolpräzipitate eines KÜ mit 0,1% Cad zur Identifizierung weiterer Substrate erneut untersucht (Abb. 4.9). In diesem Fall wurde KÜ mit Inhibitor gewählt, weil durch den möglichen Einbau von Cadaverin in reaktive Glutaminseitenketten mehr primäre Aminogruppen vorhanden sind, die sich mit ZQGB markieren lassen. Zu beachten war nur, dass gleichzeitig Lysin- und Glutaminsubstrate detektiert werden.

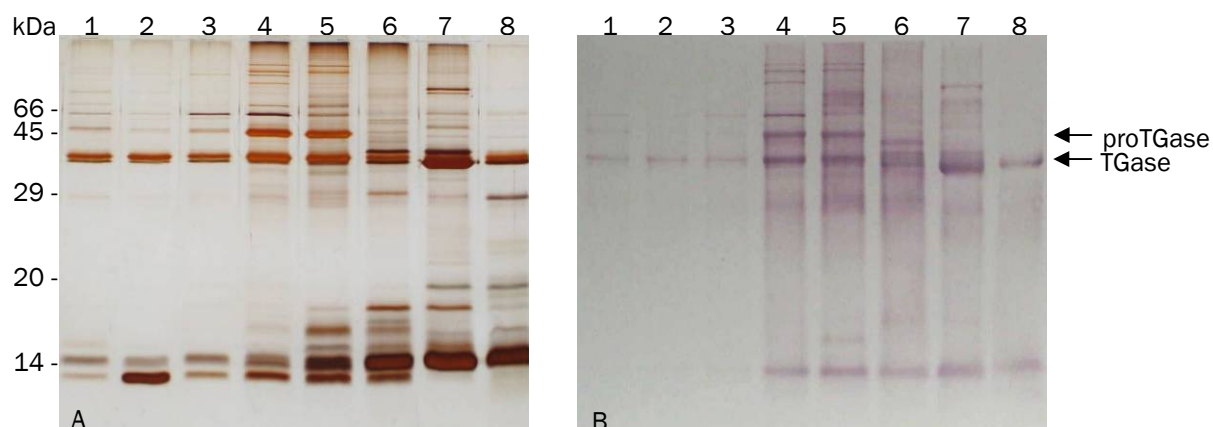


Abb. 4.9: Western Blot-Analyse der 10 – 80 Vol% Ethanolpräzipitate eines 48 h alten Kulturüberstandes von *S. mobaraensis* mit 0,1% Cadaverin im Medium nach Markierung mit ZQGB durch TGase. Die Markierungen mit 2 mM ZQGB erfolgten in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 durch 27,5 mU TGase üN bei ZT. (A) Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Nach Transfer der Proteine unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates gefärbte Nitrocellulosemembran. Spur 1 – 8: 10 – 80 Vol% Ethanolpräzipitate.

Die Markierungsversuche brachten neue Informationen, jedoch hatten die noch unbekannten Proteine mit eingebautem Biotinmarker bei 16 kDa (50 Vol% Ethanol, Spur 5), 17 kDa (60 Vol% Ethanol, Spur 6), 39 kDa (60/70 Vol% Ethanol, Spuren 6/7), 41 kDa (60 Vol% Ethanol, Spur 6), 66 kDa (40 Vol% Ethanol, Spur 4) oder mit noch höherer Molmasse sehr schmale Banden, was sehr niedrige Konzentrationen im Kulturüberstand nahe legte. Dagegen waren die bereits identifizierten Proteine bei 14 kDa (SSTI/SPI, 40 – 80 Vol% Ethanol, Spuren 4 – 8), 37 kDa (DAIP, 70/80 Vol% Ethanol, Spur 7/8) und die TGase-Proteine (38 kDa und 45 kDa) durch vergleichsweise starke Banden gut sichtbar. Zu beachten ist, dass wegen der nachträglichen enzymatischen Markierung der Präzipitate TGase in allen Spuren auftritt, wobei die Hauptmenge in den 40/50 Vol% Ethanolpräzipitaten, besonders erkenntlich an der zusätzlichen Zymogenbande bei 45 kDa, zu finden ist. Die Suche nach TGase-Substraten war mit diesem Markierungsexperiment abgeschlossen. Die neuen Ziele waren nun, die Substratproteine bei 12/14 kDa und 37 kDa zu reinigen und zu charakterisieren.

4.5 Reinigung extrazellulärer Transglutaminase-Substrate von *Streptomyces mobaraensis*

Die potentiellen Substratproteine von 12/14 kDa und 37 kDa werden, wie oben gezeigt, zwischen 40 – 80 Vol% bzw. 70 – 80 Vol% Ethanol gefällt. Damit lassen sich beide gemeinsam von Transglutaminase abtrennen, die unterhalb von 50 Vol% Ethanol präzipitiert. Die Kultivierung von *S. mobaraensis* erfolgte in Komplexmedium ohne Cadaverin für 48 h bei 28°C, um keine Cadaverin-Substrat-Konjugate zu erhalten. Die Zellaggregate wurden durch Absaugen des Kulturüberstandes mit einem Büchner-Trichter i. Vak. entfernt und das Filtrat gekühlt weiterverarbeitet. Zur Abtrennung von proTGase und reifer TGase und Konzentrierung der Substratproteine wurde eine fraktionierende Fällung zwischen 50 und 80 Vol% Ethanol gewählt. Damit sollte auch die Vernetzung oder mögliche Hydrolyse der Substrate während der Reinigung vermieden werden. Bei der anschließenden Suche nach einem für die Isolation der Proteine idealen Ionenaustauscher erwies sich das bereits für die Reinigung der TGase benutzte Fractogel EMD SO_3^- als geeignet. Auf die mit 50 mM Natrium-Acetat pH 5,0 äquilibrierte Chromatographiesäule wurde das im gleichen Puffer aufgenommene 80 Vol% Ethanolpräzipitat aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 – 1 M bei pH 5,0. Unter diesen Bedingungen wurde nur ungefähr die Hälfte des aufgetragenen 37 kDa Proteins an den Ionenaustauscher gebunden, und die

Elution erfolgte bei einer NaCl-Konzentration von ca. 0,25 M. Außerdem führte die Chromatographie nicht zur vollständigen Reinigung des 12/14 kDa großen Proteins, das bei ca. 0,4 M NaCl eluiert wurde. Zu dessen weiterer Aufreinigung wurde zunächst ohne Erfolg eine GPC bei pH 7,0 und danach eine zweite Ionenaustauschchromatographie bei pH 4,0 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert wurde das Protein bei einer NaCl-Konzentration von ca. 0,78 M von der Säule gelöst, was die bessere Bindung des Proteins an den Ionentauscher verdeutlicht. Eine nachfolgende Überprüfung des Reinigungserfolges mittels SDS-PAGE zeigte in allen Fraktionen keine Proteinverunreinigungen mehr.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem Protein von 12/14 kDa um den *Streptomyces* Papain Inhibitor SPI oder den *Streptomyces* Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor SSTI handelte, wurde die Papain- und Subtilisin-Restaktivität im Anson-Casein-Test nach Vorinkubation der jeweiligen Protease im molaren Verhältnis von 1:1 mit der Spitzenfraktion des gereinigten Proteins aus der zweiten Chromatographie ermittelt. Dabei blieb die Aktivität von Papain vollständig erhalten, die von Subtilisin hingegen wurde vollständig inhibiert. Die Messung belegte zweifelsfrei, dass es sich bei dem Protein um den 14 kDa großen SSTI handelt. Weiterhin wurde gezeigt, dass das 37 kDa große Protein mit Sicherheit das Dispase-Autolyse induzierende Protein DAIP ist. Bei einem molaren Verhältnis beider Proteine von 1:1 war keine proteolytische Aktivität mehr messbar.

Da beide Proteine Proteaseinhibitoren und mögliche TGase-Substrate sind, wurden sie für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet, um ihre Anwesenheit in Polymeren nachweisen zu können.

Durch Markierungsexperimente von SSTI und DAIP mit ZQGB und MBC durch TGase sollten deren Substrateigenschaften untersucht werden. Bei beiden Proteinen konnte mit dem biotinylierten Dipeptid ZQGB und TGase reaktive Lysine nachgewiesen werden. Die Markierung mit MBC zur Bestimmung reaktiver Glutamine war bei beiden Proteinen sehr schwach und nicht reproduzierbar. Daraufhin wurde ZQGB zwischen 0,125 und 2 mM und MBC zwischen 2 und 8 mM variiert, außerdem der pH zwischen 4 – 9. Da alle Versuche keine Erhöhung der Einbaurate brachten, wurden die ursprünglichen Bedingungen mit 125 µM ZQGB, 2 mM MBC und pH 7,5 für weitere Untersuchungen beibehalten. Auch Versuche zur Homopolymerisation von SSTI bzw. DAIP durch TGase, sowie zur Heteropolymerisation von SSTI mit Dimethylcasein scheiterten (nicht dargestellt).

Eine Erklärung war, dass beide Proteine hydrophobe Eigenschaften besitzen, die die Zugänglichkeit der TGase zum Substrat im *in vitro* genutzten wässrigen System stören

und somit die Markierung, vor allem von reaktiven Glutaminen, oder die Vernetzung behindern. Da vermutet wird, dass TGase und deren Substrate eine Rolle bei der Lufthyphenbildung spielen und bei *S. coelicolor* mit SapB und den Chaplinen natürlich vorkommende oberflächenaktive Substanzen beschrieben sind, die die Oberflächenspannung von Wasser senken können und so die Aufrichtung der hydrophoben Lufthyphen ermöglichen, wurden mit verschiedenen Detergenzien Versuche unternommen, die Proteine für die Markierungs- oder Vernetzungsreaktion in Lösung zu halten (siehe Kap. 4.8).

Eine weitere Hypothese war, dass beide Proteine während der Kultivierung von *S. mobaraensis* schwerwiegenden Modifikationen durch TGase unterliegen. Da die Elektrophorese monomere Proteine anzeigte, waren Deamidierung von Glutaminseitenketten durch Hydrolyse oder intramolekulare Vernetzung exponierter Glutamin- und Lysinseitenketten die in Frage kommenden Modifikationsreaktionen. In beiden Fällen wäre der TGase-katalysierte Einbau von Aminen nicht mehr möglich.

Um den Einfluss der TGase beurteilen zu können und unmodifizierte Substratproteine zu erhalten, wurden SSTI und DAIP aus den zellfreien Überständen von 43 h, 48 h, 66 h, 73 h und 92 h angezogenen *S. mobaraensis* Kulturen isoliert. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, weil TGase typischerweise zwischen 45 und 75 h aktiviert wird. Die Reinigung erfolgte wie bereits beschrieben durch fraktionierende Ethanolfällung zwischen 50 und 80 Vol% und anschließende Ionenaustauschchromatographie mit Fractogel EMD SO_3^- . Eine erhebliche Verbesserung der Bindung von DAIP und SSTI an das Säulenmaterial gegenüber dem vorangegangenen Verfahren brachte die Absenkung des pH auf 4,0, was bereits die Analyse des Vorlaufs durch SDS-PAGE zeigte. Insbesondere DAIP-Verluste traten nicht mehr auf. Die Elution beider Substratproteine erfolgte mit einem zweistufigen NaCl-Gradient von 0 – 0,5 und 0,5 – 1 M NaCl im gleichen Puffer. Dieser Gradient wurde gewählt, da bereits in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass DAIP bei pH 4,0 mit ca. 0,35 M NaCl und SSTI mit ca. 0,78 M NaCl eluiert wird. Weitere Versuche zeigten, dass mit einem flacheren Gradienten die kurzzeitige Einhaltung einer konstanten NaCl-Konzentration bei 0,5 M nicht mehr notwendig ist (nicht dargestellt).

Die höchste Reinheit beider Proteine wurde mit 48 h alten Kulturen von *S. mobaraensis* erzielt (Abb. 4.10). DAIP aus älteren Kulturen enthielt mehrere kleine Verunreinigungen. DAIP (Gipfel A) wurde als erstes Protein nach 78 – 100 min bei 0,38 M NaCl von der Säule eluiert, SSTI nach 173 – 185 min bei 0,72 M NaCl. Dabei ist an der linken Flanke des DAIP-Gipfels deutlich eine Schulter zu erkennen, die bei ca. 88 min und 0,35 M NaCl ihre Spitze erreicht.

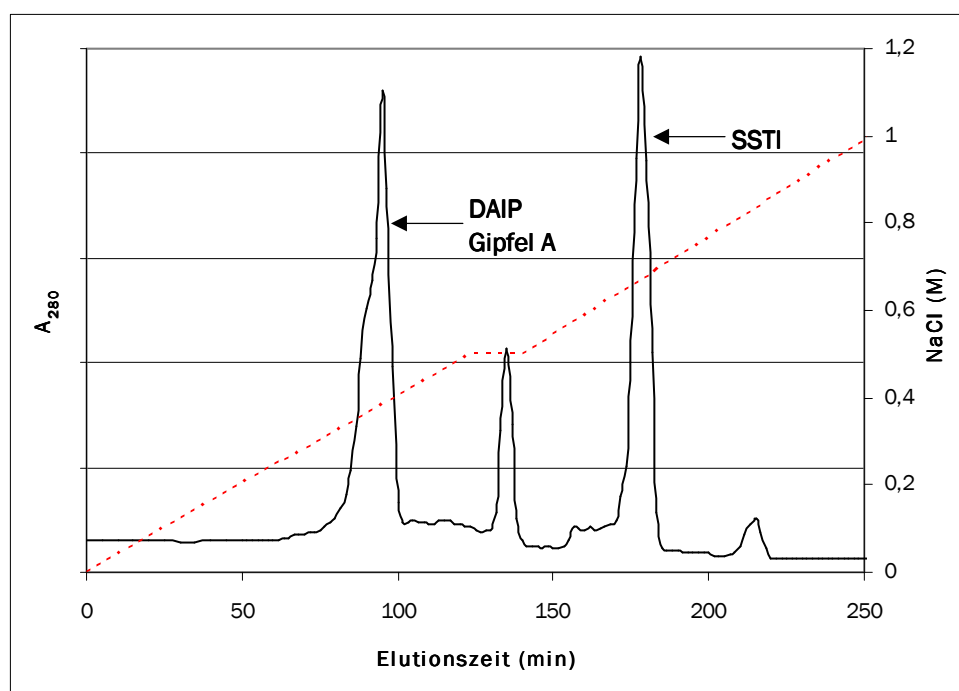


Abb. 4.10: Reinigung von DAIP und SSTI aus dem KÜ einer 48 h alten Flüssigkultur von *Streptomyces mobaraensis*. Das 80 Vol% Ethanolpräzipitat eines zellfreien Überstandes wurde mit Fractogel EMD SO_3^- (12 ml Bettvolumen) bei pH 4,0 aufgetrennt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem zweistufigen Gradienten von 0 – 0,5 und 0,5 – 1 M NaCl in 50 mM Natrium-Acetat pH 4,0, welcher rot dargestellt ist.

Die Überprüfung des Reinigungserfolges mittels SDS-PAGE zeigte in den Spitzenfraktionen von DAIP und SSTI keine Verunreinigungen durch Fremdproteine mehr. Die im Chromatogramm sichtbare Schulter des DAIP-Gipfels wurde offensichtlich nicht von einem zweiten Protein verursacht (nicht dargestellt). Die Ausbeuten betrugen insgesamt ca. 90 – 100 mg DAIP und 100 – 110 mg SSTI je Liter Kulturüberstand.

In Abb. 4.11 ist zum Vergleich das Chromatogramm der Reinigung von DAIP und SSTI aus dem Ethanolpräzipitat einer 66 h alten Kultur dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach einer Retentionszeit von 90 – 100 min bei einer NaCl-Konzentration von 0,39 M erstmals ein neuer Gipfel auftaucht. Dieser hatte Aktivität (Anson-Casein-Test mit Dispase) und Molmasse (SDS-PAGE) von DAIP. Der DAIP-Hauptgipfel eluierte in diesem Fall nach 75 – 90 min und 0,36 M NaCl von der Säule. Mittels SDS-PAGE konnte auch gezeigt werden, dass neben einigen schwachen Verunreinigungen mit dem DAIP-Hauptgipfel (Gipfel B) ein 29 kDa großes Protein und mit dem zweiten Gipfel (Gipfel A) ein 20 kDa großes Protein koeluierten, die durch eine Western Blot-Analyse mit DAIP-Antikörpern nicht nachgewiesen werden konnten und somit keine Abbauprodukte des Inhibitors sind. Gleichzeitig tauchte oberhalb von 67 kDa eine Bande auf, die eine signifikante Reaktion der Antikörper hervorrief und bei der es sich möglicherweise um ein durch TGase erzeugtes Dimer handelte (Abb. 4.12). Die Aufreinigungen nach Kultivierungszeiten von

73 – 93 h zeigten vergleichbare Ergebnisse, wo stets einem großen Hauptgipfel ein kleiner Restgipfel folgte (nicht dargestellt).

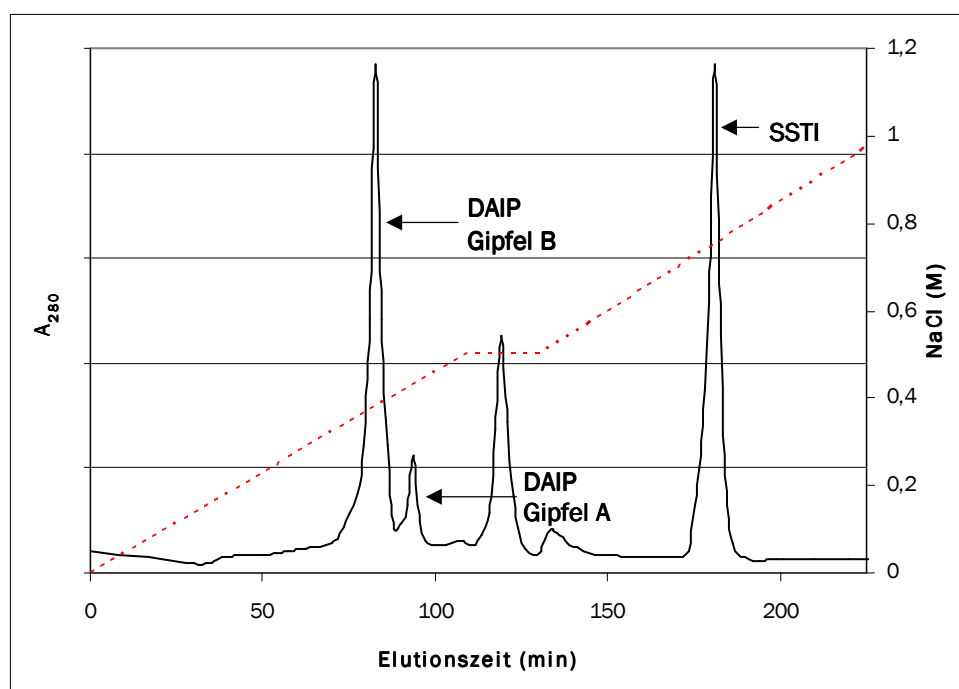


Abb. 4.11: Reinigung von DAIP und SSTI aus dem KÜ einer 66 h alten Flüssigkultur von *Streptomyces mobaraensis*. Das 80 Vol% Ethanolpräzipitat eines zellfreien Überstandes wurde mit Fractogel EMD SO_3^- (12 ml Bettvolumen) bei pH 4,0 aufgetrennt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem zweistufigen Gradienten von 0 – 0,5 und 0,5 – 1 M NaCl in 50 mM Natrium-Acetat pH 4,0, welcher rot dargestellt ist.

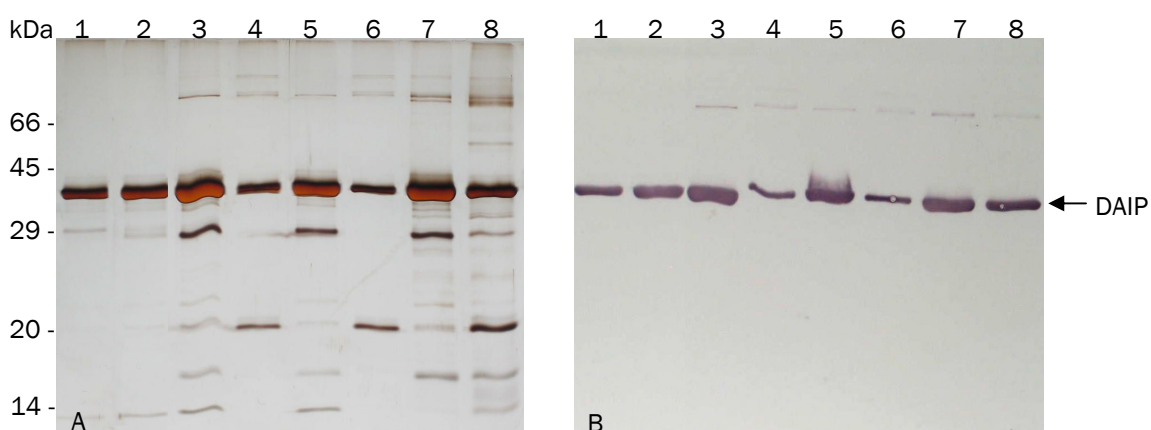


Abb. 4.12: Western Blot-Analyse von gereinigtem DAIP aus unterschiedlich alten Kulturüberständen von *S. mobaraensis*. (A) Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Immunchemisch, nach Inkubation mit polyklonalen AK gegen DAIP, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1: DAIP 43 h (Gipfel A); Spur 2: DAIP 48 h (Gipfel A); Spur 3: DAIP 66 h (Gipfel B); Spur 4: DAIP 66 h (Gipfel A); Spur 5: DAIP 73 h (Gipfel B); Spur 6: DAIP 73 h (Gipfel A); Spur 7: DAIP 93 h (Gipfel B); Spur 8: DAIP 93 h (Gipfel A).

Die Retentionszeit von SSTI lag wie bei der Isolation aus 48 h altem KÜ zwischen 173 – 185 min, was einer NaCl-Konzentration von 0,75 M entsprach. Bei SSTI zeigten die

Chromatogramme aller KÜ vergleichbare Ergebnisse mit ähnlichen Retentionszeiten. Die bei DAIP auffallenden Verunreinigungen, traten bei allen Proben nicht auf (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass DAIP während des Kultivierungsverlaufs vermutlich einer Veränderung unterliegt, die den zweiten DAIP-Gipfel im Chromatogramm hervorruft. Gleichzeitig entstehen Proteine, die ähnlich fest an den Kationenaustauscher binden, somit koeluieren und als Verunreinigungen bei den 66 – 93 h alten Proben auftauchen. Mögliche Veränderungen von DAIP, die zu zwei Gipfeln im Chromatogramm führen, könnten Deamidierung oder der Aufbau intramolekularer Brücken durch TGase sein, sodass DAIP mehr negative Ladungen erhält, dadurch schlechter an den Ionenaustauscher bindet und früher eluiert wird. In geringen Mengen scheint DAIP während der Kultur von *S. mobaraensis* durch TGase vernetzt zu werden, was die oberhalb von 67 kDa liegende Bande, mit der die DAIP-Antikörper reagieren, nahe legt. Verglichen mit DAIP zeigte sich bei SSTI keine Gipfelverschiebung im Chromatogramm, und auch das Elektrophoresegel wies nur eine einzige Proteinbande auf.

Markierungs- und Vernetzungsexperimente sollten anschließend klären, ob es sich bei DAIP und SSTI um TGase-Substrate handelt, und in welchem Ausmaß sie während der Kultivierung einer Deamidierung durch das Enzym ausgesetzt waren.

4.6 Untersuchung der Substrateigenschaften von SSTI und DAIP

4.6.1 Untersuchungen mit biotinylierten Markern

Wie bereits erwähnt, kann mit dem biotinylierten Amin MBC und dem biotinylierten Peptid ZQGB zwischen reaktiven Glutamin- und Lysinresten unterschieden werden.

Im Fall von DAIP wurde ein offenes Elektrophoresegel (7,5% oder 10%) verwendet, um DAIP (37 kDa) und reife TGase von *S. mobaraensis* (38 kDa) unterscheiden zu können. Kontrollen sollten die Eigenmarkierung von TGase oder die unspezifische Bindung der hydrophoben Reagenzien aufzeigen.

Markierungsversuche wurden zunächst mit dem aus 43 – 93 h alten Kulturüberständen isoliertem SSTI bei pH 7,5 für 2 h bei 37 °C durchgeführt. In Abb. 4.13 ist das Ergebnis der TGase-katalysierten Markierung dieser 5 Proben mit ZQGB dargestellt.

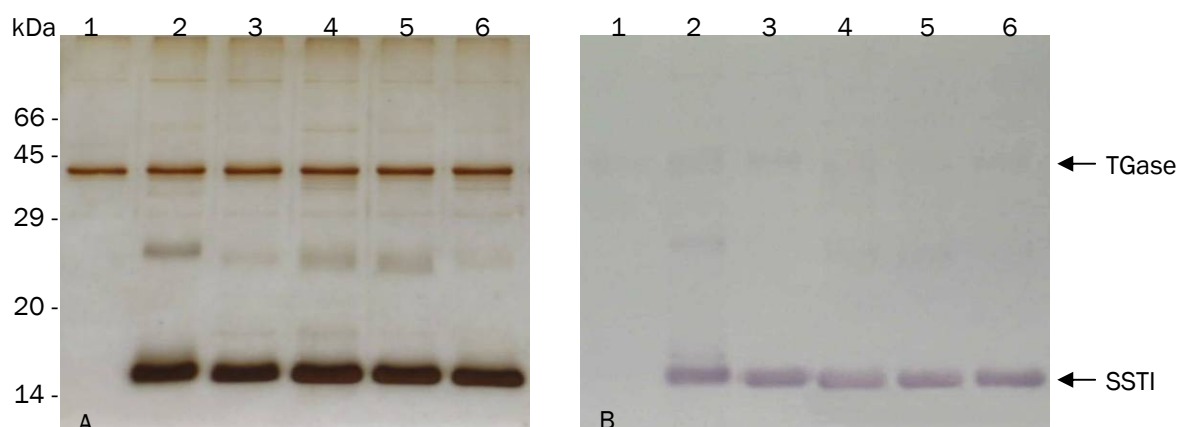


Abb. 4.13: Western Blot-Analyse von gereinigtem SSTI aus unterschiedlich alten Kulturüberständen von *S. mobaraensis* nach Markierung mit ZQGB durch TGase. Je 4,5 µg SSTI wurden in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 125 µM ZQGB und 27,5 mU TGase für 2 h bei 37 °C inkubiert. (A) Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Nach Transfer der Proteine unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembran. Spur 1: TGase; Spur 2: SSTI 43 h; Spur 3: SSTI 48 h; Spur 4: SSTI 66 h; Spur 5: SSTI 73 h; Spur 6: SSTI 93 h.

Es ist erkennbar, dass die TGase-Kontrolle (Abb. 4.13B, Spur 1) eine sehr schwache Markierung aufweist und das Enzym sich selbst in geringem Maß als Lysinsubstrat akzeptiert. Parallel dazu wurden Kontrollansätze ohne TGase durchgeführt, bei denen keine Biotinylierung von SSTI stattfand (nicht dargestellt). In allen Ansätzen, die SSTI und TGase enthielten, war zweifelsfrei die Hauptbande biotinyliert, zusätzlich eine sehr schwache Bande bei ca. 25 kDa, die wahrscheinlich ein SSTI-Dimer darstellte (Abb. 4.13B, Spuren 2 – 6). Die weitere Polymerisierung wurde aber durch das kompetitiv inhibierende Peptid ZQGB verhindert. Das Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor um ein Lysindonorsubstrat handelt, das während der Kultivierung von *S. mobaraensis* keine Veränderung an der ϵ -Aminofunktion erfährt.

Anders verliefen die Biotinylierungsversuche mit MBC zum Nachweis reaktiver Glutaminreste (Abb. 4.14). Ähnlich dem vorangegangenen Versuch war auch hier eine schwache Markierung von TGase zu erkennen (Abb. 4.14B, Spur 1). Das Enzym akzeptiert sich in geringem Maß auch als Glutaminsubstrat. In den SSTI-Kontrollansätzen ohne Enzym war keine Biotinylierung feststellbar (nicht dargestellt). Bei der Markierung mit MBC zeigte sich, dass SSTI ein Glutaminsubstrat ist. Die 43 h Probe war deutlich markiert. Die Reaktionsmischung enthielt zusätzlich das bereits oben angesprochene SSTI-Dimer mit einer Molmasse von ca. 25 kDa. Interessanterweise nahm die Markierung der Glutamine bei den Proben aus den 48 – 93 h alten Kulturen deutlich gegenüber der 43 h alten Probe ab, was dafür spricht, dass die Glutamine während der Kultivierung durch TGase deamidiert werden. Würden intramolekulare Isopeptidbindungen geknüpft,

müsste die Markierung der Lysine in gleicher Weise beeinflusst sein, da ihre verfügbare Anzahl ebenfalls reduziert würde.

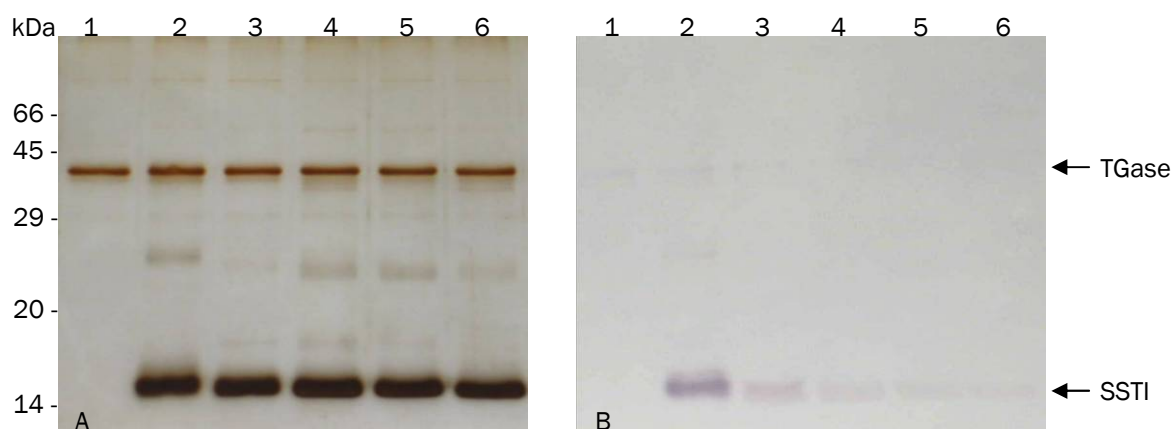


Abb. 4.14: Western Blot-Analyse von gereinigtem SSTI aus unterschiedlich alten Kulturüberständen von *S. mobaraensis* nach Markierung mit MBC durch TGase. Je 4,5 µg SSTI wurden in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 2 mM MBC und 27,5 mU TGase für 2 h bei 37 °C inkubiert. (A) Silbergefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Nach Transfer der Proteine unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembran. Spur 1: TGase; Spur 2: SSTI 43 h; Spur 3: SSTI 48 h; Spur 4: SSTI 66 h; Spur 5: SSTI 73 h; Spur 6: SSTI 93 h.

Nachdem sich SSTI als Lysin- und Glutamindonorsubstrat erwiesen hatte, sollte in analogen Biotinylierungsansätzen untersucht werden, ob es sich bei DAIP ebenfalls um ein TGase-Substrat handelt. Dabei wurden jeweils die bei der Reinigung der Inhibitoren (4.5) gewonnenen DAIP-Fractionen des Hauptgipfels (erstes eluierendes Protein) verwendet. In Abb. 4.15 ist das Ergebnis der TGase-katalysierten Markierung von DAIP aus 48 – 93 h alten Kulturüberständen mit ZQGB dargestellt.

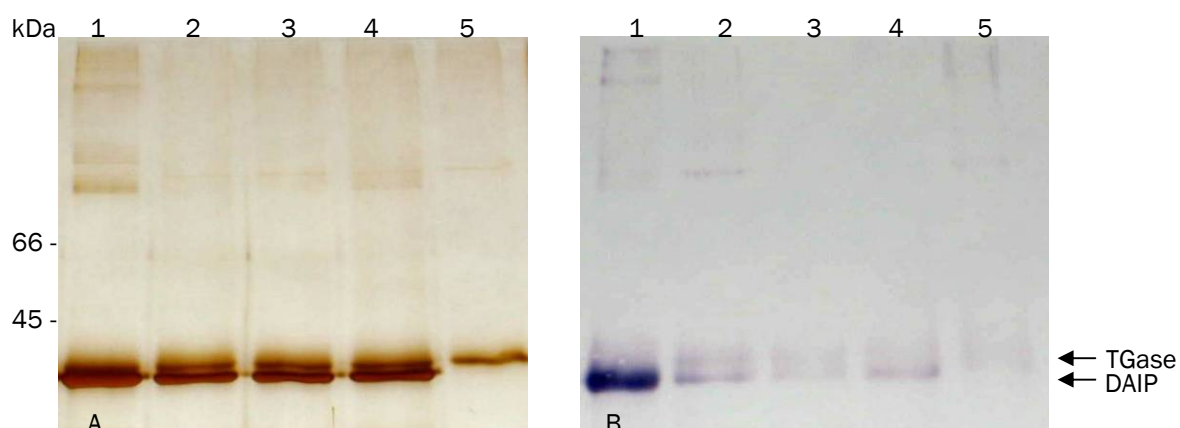


Abb. 4.15: Western Blot-Analyse von gereinigtem DAIP aus unterschiedlich alten Kulturüberständen von *S. mobaraensis* nach Markierung mit ZQGB durch TGase. Je 3,6 µg DAIP wurden in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 125 µM ZQGB und 27,5 mU TGase für 2 h bei 37 °C inkubiert. (A) Silbergefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Nach Transfer der Proteine unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembran. Spur 1: DAIP 48 h; Spur 2: DAIP 66 h; Spur 3: DAIP 73 h; Spur 4: DAIP 93 h; Spur 5: TGase.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die TGase-Kontrolle eine schwache Markierung aufweist, sich die Bande aber auch knapp oberhalb der des Inhibitors befindet (Abb. 4.15, Spur 5). In den DAIP-Kontrollen ohne Zugabe des Enzyms konnte keine Biotinylierung mittels Western Blot-Analyse durch Visualisierung mit dem Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat festgestellt werden (nicht dargestellt), sodass DAIP in Abb. 4.15B in den Spuren 1 – 4 zweifelsfrei markiert vorliegt und somit ein Lysinsubstrat für TGase darstellt. Auch konnte ZQGB die Vernetzung von DAIP nicht komplett verhindern, da bei ca. 74 kDa und am Einlauf zum Trenngel mehrere Banden sichtbar sind, bei denen es sich um das Dimer oder Polymere von DAIP handeln dürfte (Spur 1). Anders als bei SSTI, nahm der Markierungsgrad der DAIP-Lysine mit dem Alter des verwendeten Kulturüberstands ab, am stärksten zwischen den 48 h und 66 h alten Proben, also in dem Zeitraum, in dem während der Kultur TGase aktiviert wird. Die Bande des 48 h alten DAIP ist intensiv gefärbt, während die anderen Proteine nur noch wie TGase schwach markiert sind.

Analog zur Markierung der Lysine wurde mit DAIP aus 48 – 93 h alten Kulturen ebenfalls Biotinylierungsversuche mit MBC durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.16 dargestellt. In Abb. 4.16B ist deutlich zu erkennen, dass MBC nur in 48 h alten DAIP eingebaut wurde, wohingegen bei allen anderen Proben die Markierung scheiterte. Bei DAIP handelt es sich somit neben einem Lysin- auch um ein Glutaminsubstrat für TGase. Auch hier wurde wieder die Biotinylierung der TGase beobachtet (Spur 5). Wie die schwache Bande bei ca. 74 kDa in Spur 1 zeigt, konnte das kompetitiv inhibierende Amin MBC die Bildung eines Dimers von DAIP nicht vollständig verhindern.

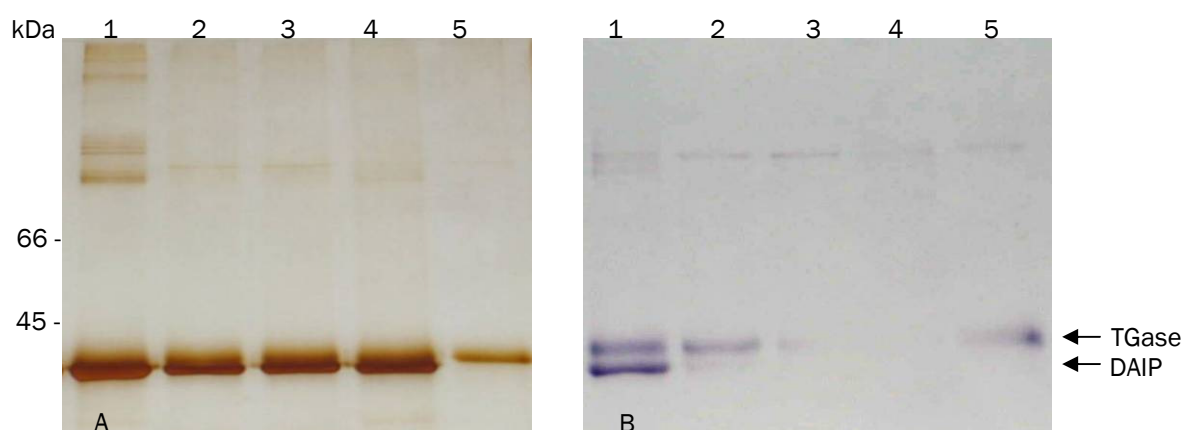


Abb. 4.16: Western Blot-Analyse von gereinigtem DAIP aus unterschiedlich alten Kulturüberständen von *S. mobaraensis* nach Markierung mit MBC durch TGase. Je 3,6 µg DAIP wurden in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 2 mM MBC und 27,5 mU TGase für 2 h bei 37°C inkubiert. (A) Silbergefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Nach Transfer der Proteine unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembran. Spur 1: DAIP 48 h; Spur 2: DAIP 66 h; Spur 3: DAIP 73 h; Spur 4: DAIP 93 h; Spur 5: TGase.

Bei DAIP erscheint auf den ersten Blick der Aufbau von intramolekularen Brücken zwischen *endo*-Glutaminen und *endo*-Lysinen wahrscheinlicher als eine Deamidierung, da beide reaktiven Seitenketten verschwinden. Dagegen sprechen die Ergebnisse mit SSTI. Wie noch mit Substratmodulatoren (siehe Kap. 4.8) gezeigt werden wird, ist in der Tat auch die Hydrolyse die wahrscheinlichste DAIP-Modifikation während der Kultivierung von *S. mobaraensis*.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es sich bei SSTI und DAIP um physiologische Lysin- und Glutaminsubstrate der TGase von *S. mobaraensis* handelt. Es wurde festgestellt, dass die reaktiven Glutamine von SSTI während des Kultivierungsverlaufs wahrscheinlich deamidiert werden und somit nicht mehr für die Bildung von Isopeptidbindungen zur Verfügung stehen, die reaktiven Lysine aber unverändert bleiben. Im Gegensatz dazu trat bei DAIP sowohl bei Glutaminen als auch bei Lysinen eine verminderte Markierbarkeit im Kultivierungsverlauf auf, was eine intramolekulare Brückenbildung nahe legt. Der Widerspruch zwischen Hydrolyse und Entstehung intramolekularer Isopeptidbindungen war im Folgenden weiter zu untersuchen.

4.6.2 Nachweis im Zellwandpolymer

Das fluoreszenzmarkierten Zellwandpolymer sollte nach SDS-PAGE und anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit SSTI- und DAIP-spezifischen Antikörpern inkubiert werden, um nachzuweisen, ob beide Proteine in der Zellwand verankert werden und somit TGase-Substrate sind, die möglicherweise am Aufbau der Lufthyphen beteiligt sein könnten. Diese Untersuchungen wurden zusätzlich für TGase selbst und TAMEP durchgeführt, da auch bei diesen eine Verankerung in der Zellwand vermutet wird. Der Nachweis erfolgte durch alkalische Phosphatase-konjugierte Zweitantikörper. In Abb. 4.17 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse dargestellt. SSTI, DAIP, TAMEP und TGase konnten mit spezifischen Antikörpern im fluoreszenzmarkierten Zellwandpolymer am Einlauf zum Sammel- und Trenngel nachgewiesen werden. SSTI wurde zusätzlich in monomerer Form bei 14 kDa und als Oligomer bei ca. 70 kDa nachgewiesen. Somit ist ein erster Hinweis erbracht, dass sowohl TGase als auch deren aktivierende Protease TAMEP und die Substrate SSTI und DAIP in die Zellwand von *S. mobaraensis* eingebaut werden könnten.

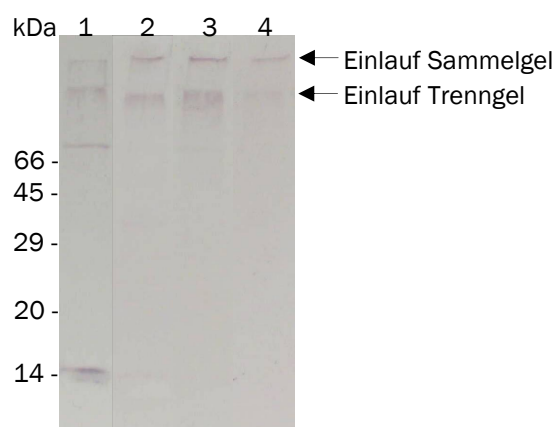


Abb. 4.17: Western Blot-Analyse des fluoreszenzmarkierten Zellwandpolymers von *S. mobaraensis* unter Verwendung SSTI-, DAIP-, TAMEP- und TGase-spezifischer Antikörper. Immunchemisch, nach Inkubation mit polyklonalen AK gegen die jeweiligen Proteine gefärbte Nitrocellulosemembran gleicher Mengen an Zellwandpolymer. Spur 1: Verwendung von anti-SSTI-IgG; Spur 2: Verwendung von anti-DAIP-IgG; Spur 3: Verwendung von anti-TAMEP-IgG; Spur 4: Verwendung von anti-TGase-IgG.

4.6.3 Polymerisierungsversuche mit SSTI und DAIP

Durch eine zeitabhängige Vernetzung von SSTI und DAIP sollte zusätzlich bewiesen werden, dass es sich bei beiden Proteinen um intrinsische Substrate der TGase von *S. mobaraensis* handelt. Dazu wurden die gegen beide Proteine hergestellten polyklonalen Antikörper verwendet, um die neu gebildeten Proteinaggregate von TGase-Polymerisaten unterscheiden zu können.

Für die Vernetzung wurde SSTI aus einer 43 h alten Kultur für bis zu 8 h bei 37 °C und pH 7,5 mit TGase inkubiert. Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und SSTI sowie dessen Produkte nach Inkubation mit SSTI-spezifischen Antikörpern durch alkalische Phosphatase-konjugierte Zweitantikörper sichtbar gemacht. Das Ergebnis der zeitaufgelösten TGase-katalysierten Vernetzung von SSTI ist in Abb. 4.18 dargestellt.

Gereinigter SSTI enthielt bereits eine Spur Dimer, was im Western Blot in der SSTI-Kontrolle (Spur 7) und somit auch in der ersten Polymerisationsprobe direkt nach dem Mischen der beiden Proteine (Spur 1) zu erkennen ist. Die dimere Bande bei ca. 25 kDa wurde im Verlauf der Inkubation beider Proteine verstärkt und zur dominanten Bande nach dem Monomer. Bereits nach 2 h (Spur 4) waren auch höhermolekulare Aggregate sichtbar, die nach einer Inkubation von bis zu 8 h (Spur 6) noch leicht verstärkt werden konnten, es wurde jedoch keine vollständige Polymerisation erreicht. Mit diesem Versuch konnte ein weiterer Beweis gefunden werden, dass es sich bei dem niedermolekularen Proteaseinhibitor um ein physiologisches Substrat von TGase handelt.

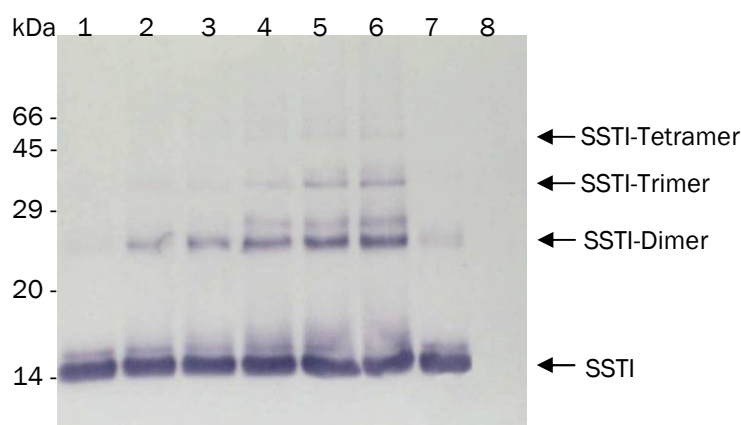


Abb. 4.18: Vernetzung von SSTI aus 43 h altem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* durch TGase. TGase (0,358 mg/ml) wurde in einem molaren Verhältnis von 1:10 mit SSTI (0,225 mg/ml) in 0,1 M HEPES pH 7,5 bei 37 °C bis zu 8 h inkubiert. Immunchemisch, nach Inkubation mit SSTI-spezifischen Antikörpern, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1: SSTI + TGase 0 h; Spur 2: SSTI + TGase 0,5 h; Spur 3: SSTI + TGase 1 h; Spur 4: SSTI + TGase 2 h; Spur 5: SSTI + TGase 4 h; Spur 6: SSTI + TGase 8 h; Spur 7: SSTI; Spur 8 TGase.

Um auch DAIP weiter als Substrat zu charakterisieren, wurde ebenfalls ein Vernetzungsversuch durchgeführt. Der aus einer 48 h alten Kultur isolierte Inhibitor wurde mit TGase bei 37 °C und pH 7,5 bis zu 8 h inkubiert. Die nach SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden nach Inkubation mit DAIP-spezifischen Antikörpern ebenfalls durch alkalische Phosphatase-konjugierte Zweitantikörper sichtbar gemacht. Das Ergebnis ist in Abb. 4.19 dargestellt.

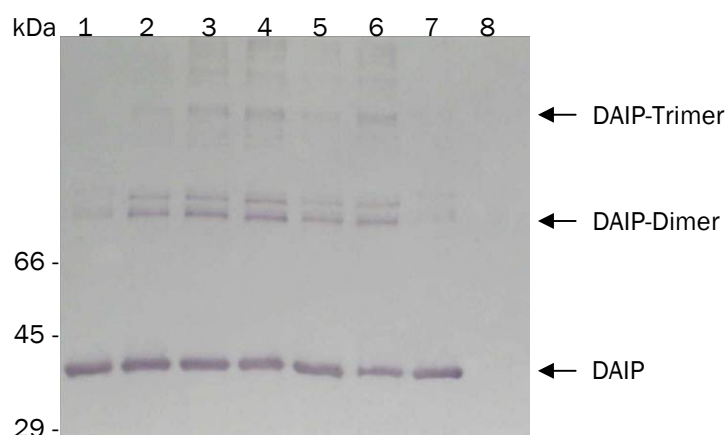


Abb. 4.19: Vernetzung von DAIP aus 48 h altem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* durch TGase. TGase (0,358 mg/ml) wurde in einem molaren Verhältnis von 1:10 mit DAIP (0,343 mg/ml) in 0,1 M HEPES pH 7,5 bei 37 °C bis zu 8 h inkubiert. Immunchemisch, nach Inkubation mit DAIP-spezifischen Antikörpern, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1: DAIP + TGase 0 h; Spur 2: DAIP + TGase 0,5 h; Spur 3: DAIP + TGase 1 h; Spur 4: DAIP + TGase 2 h; Spur 5: DAIP + TGase 4 h; Spur 6: DAIP + TGase 8 h; Spur 7: DAIP; Spur 8 TGase.

Gereinigter DAIP enthielt ebenfalls bereits eine Spur Dimer, wie in der DAIP-Kontrolle (Spur 7) erkennbar ist, sodass dieses auch in der ersten Polymerisierungsprobe direkt nach dem Mischen enthalten war (Spur 1). Bei DAIP wurde das Dimer während der

Inkubation mit TGase verstärkt und bereits nach 1 h (Spur 3) waren weitere polymere Banden im Western Blot zu erkennen, welche wahrscheinlich Trimere und höhere Aggregate waren. Nach 4 – 8 h konnte keine weitere Verstärkung der Polymerisierung mehr erreicht werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die zeitaufgelöste Polymerisation sowohl bei SSTI als auch bei DAIP eine eindeutige Vernetzung durch TGase gezeigt werden konnte. Die Experimente bestätigten somit die Markierungsversuche beider Proteine mit biotinylierten Markern. Beide aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* gereinigten Inhibitoren besitzen zweifelsfrei reaktive Glutamin- und Lysinreste und sind somit physiologische Substrate der bakteriellen TGase.

In folgenden Untersuchungen sollten diese Proteine weiter charakterisiert werden.

4.7 Charakterisierung der Transglutaminase-Substrate

4.7.1 Eigenschaften von SSTI

In der Dissertation von Zotzel (2002) wurde SSTI, damals wegen seines Molekulargewichts von 14 kDa als p14 bezeichnet, bereits teilweise charakterisiert. Äquimolare und doppelte Mengen an SSTI reduzierten die TAMEP-Aktivität gegenüber Furylacryloyldipeptidylamiden um 50 bzw. 80%. Wurde proTGase als TAMEP-Substrat verwendet, konnte die halbmaximale Inhibition des Enzyms bei einem Inhibitor-Enzym-Verhältnis von ca. 0,25 ermittelt werden, und eine vollständige Inhibition benötigte äquimolare Mengen beider Proteine (Zotzel et al. 2003a). Diese Ergebnisse wurden durch Messungen mit Dabcyl-Ser-Phe-EDANS, dessen Peptidsequenz von der TAMEP-Bindungsstelle im Aktivierungspeptid von TGase abgeleitet wurde (Weimer et al. 2006), bestätigt. Dabei ist anzumerken, dass der Fluoreszenz-Assay mit dem synthetischen Substrat Dabcyl-Ser-Phe-EDANS wesentlich sensitiver als der UV-P1'-Protease-Assay mit Furylacryloyldipeptidylamiden ist. Außerdem reduzierte SSTI die Aktivität von Thermolysin bei einem Inhibitor-Enzym-Verhältnis von 200 zu ca. 65%, die halbmaximale Inhibition lag bei einem Verhältnis I/E von ca. 60.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivität von SSTI gegen Subtilisin A von *B. licheniformis* und Trypsin von *Bos taurus* untersucht. Da mit dem Anson-Casein-Test nur die allgemeine, unspezifische proteolytische Aktivität einer Protease gemessen werden kann, wurden für diese Untersuchungen synthetische Proteasesubstrate verwendet, um genauere Messdaten zu erhalten. Mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA als Subtilisin-Substrat wurde eine halbmaximale Inhibition des Enzyms bei einem molaren Inhibitor-Enzym-Verhältnis von ca. 1,5 ermittelt, eine vollständige Inhibition konnte nicht gezeigt werden, sondern nur eine Hemmung um 86% bei einem molaren Verhältnis von 4 (Abb. 4.20). Wurde Casein als Substrat im Anson-Casein-Test eingesetzt, lag die halbmaximale Inhibition bei einem I/E-Verhältnis von ca. 1,25, doppelte Mengen an SSTI führten zu einer vollständigen Inhibierung von Subtilisin A (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Substrat die Inhibitorwirkung von SSTI wesentlich beeinflusst. Das kleine Peptid kann offensichtlich nicht mehr vollständig vom proteinogenen Inhibitor verdrängt werden.

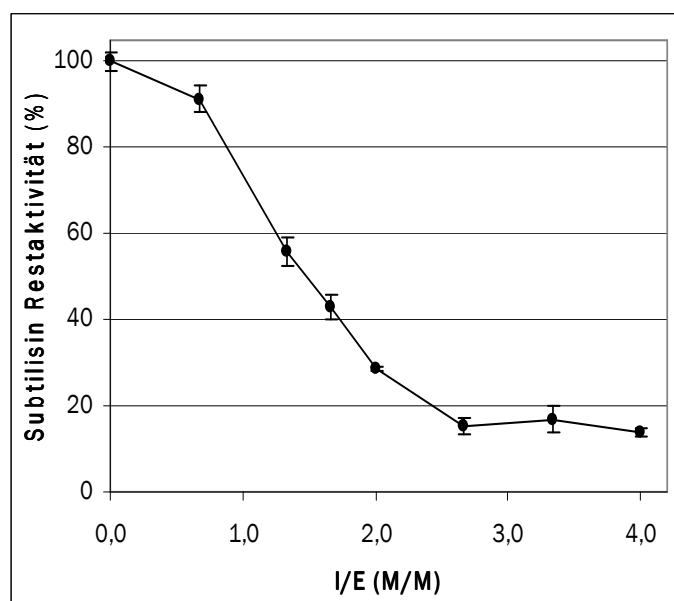


Abb. 4.20: Effekt von gereinigtem SSTI auf die Aktivität von Subtilisin A von *B. licheniformis*. 10 μ l (2,05 μ g/ml) Subtilisin A in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM CaCl_2 und verschiedene Konzentrationen an SSTI wurden für 30 min bei ZT inkubiert und die Protease-Restaktivität wurde im Aktivitätstest für P1-Proteasen mit 0,4 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Die Messungen mit Trypsin wurden mit Bz-Arg-pNA als Substrat durchgeführt. Für dieses Enzym lag die halbmaximale Inhibition bei einem Inhibitor-Enzym-Verhältnis von ca. 0,69, eine vollständige Inhibition erfolgte bei einem molaren Verhältnis von 6 (Abb. 4.21).

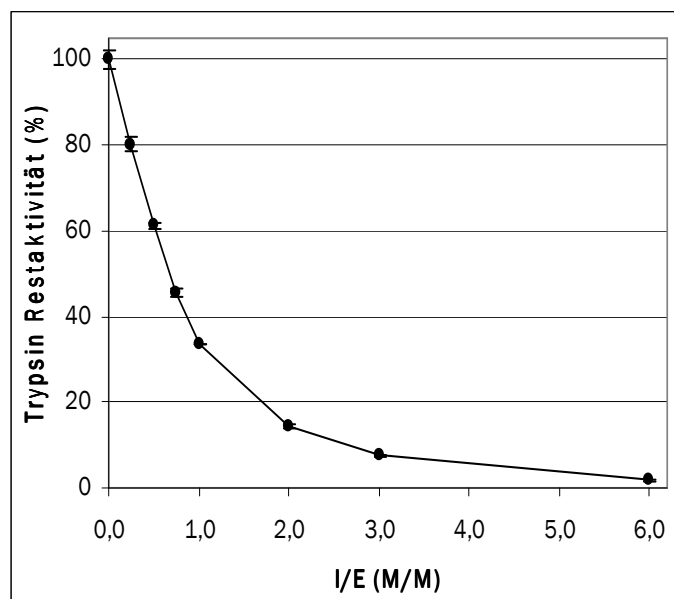


Abb. 4.21: Effekt von gereinigtem SSTI auf die Aktivität von Trypsin von *Bos taurus*. 15 μ l (1,679 mg/ml) Trypsin in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM CaCl_2 und verschiedene Konzentrationen an SSTI wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Protease-Restaktivität wurde im Aktivitätstest für P1-Proteasen mit 0,4 mM Bz-Arg-pNA bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Zur weiteren Charakterisierung des Inhibitors wurden die Inhibitorkonstanten (K_i) für Subtilisin A und Trypsin bestimmt. Die experimentellen Daten wurden bei drei konstanten Substratkonzentrationen durch Variation der Inhibitormenge ermittelt und nach der Methode von Dixon (1953) ausgewertet. Hierbei kann die Inhibitorkonstante für die kompetitive Hemmung (K_{ic}) direkt aus dem Diagramm abgelesen werden, da die x-Koordinate des gemeinsamen Schnittpunktes der resultierenden Geraden den Wert $-K_i$ ergibt. Für den selteneren Fall, dass die Inhibitorkonstante für die kompetitive Hemmung größer als die für die nicht-kompetitive Hemmung ($K_{ic} > K_{iu}$) ist, liegt der Schnittpunkt unterhalb der Abszisse. Der Nachteil der Methode ist jedoch, dass sowohl die nicht-kompetitive Hemmung ($K_{ic} < K_{iu}$), als auch die kompetitive Hemmung gleiche Geradenmuster mit gemeinsamen Schnittpunkten im zweiten Quadranten liefern, was ihre Unterscheidung unmöglich macht.

Für Subtilisin A konnten anfänglich keine konsistenten Daten erhalten werden, da das Enzym in der für die Messung notwendigen Verdünnung von 1,5 nM nicht ausreichend stabil war und innerhalb der Dauer einer Messreihe (max. 1,5 h) bis zu 8% der Aktivität verlor. Daher wurden Pufferadditive zur Stabilisierung von Subtilisin A getestet (Tab. 4.1). Der Einfluss der einzelnen Substanzen wurde direkt nach Zugabe und nach 1,5 h Inkubation auf Eis durch Messung der Subtilisin-Aktivität im Aktivitätstest für P1-Proteasen bestimmt.

Tab. 4.1: Aktivität von Subtilisin A von *B. licheniformis* ohne und mit verschiedenen Pufferadditiven. Die Messung erfolgte in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM CaCl₂ und 0,2 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA im Aktivitätstest für P1-Proteasen.

Stabilisator	ohne Zusatz	150 mM NaCl	500 mM NaCl	30% Glycerin	5% Trehalose	5% Saccharose	1% Tween 20	1% TritonX100
Inkubation	Subtilisin-Aktivität in %							
0 h	100	119,6	127,8	128,7	128,3	129,5	148,3	147,6
1,5 h	92,4	119,8	128,5	122,2	126,5	128,5	148,9	142,3

Alle eingesetzten Substanzen führten zu einer Aktivitätssteigerung von Subtilisin A um ca. 20 – 50% direkt nach Zugabe. Nach einer Lagerung von 1,5 h auf Eis hatte die Subtilisin-Aktivität bei den meisten Additiven abgenommen, lag aber dennoch über der Ausgangsaktivität von Subtilisin A im 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM CaCl₂ ohne Stabilisator. Für die weiteren Messungen wurde anhand dieser Untersuchungen 150 mM NaCl als Stabilisator eingesetzt, da es die Aktivität am geringsten erhöhte und Subtilisin auch nach 1,5 h stabil hielt.

Bei Einsatz von 1 nM Subtilisin A und 4 – 30 nM SSTI wurde unter Verwendung von 0,2 – 0,4 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ein K_i von ca. 44,2 nM ermittelt (Abb. 4.22).

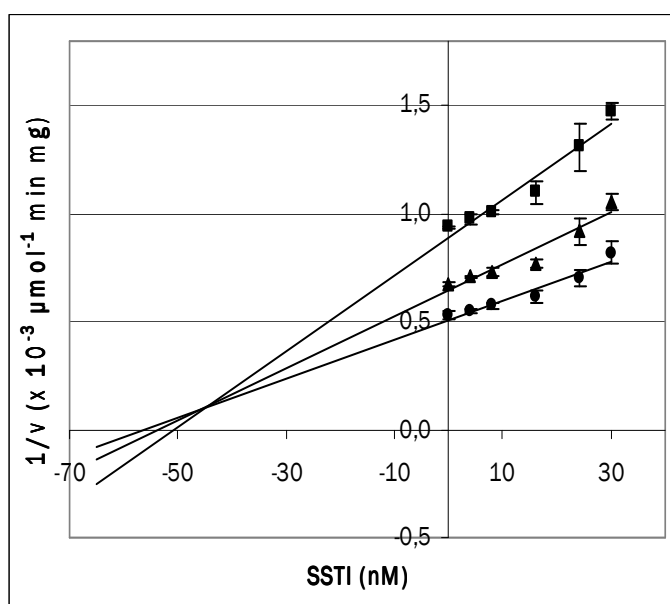


Abb. 4.22: Bestimmung der Inhibitorkonstante K_i von SSTI gegen Subtilisin A von *B. licheniformis*. Verschiedene Konzentrationen an SSTI (4 – 30 nM) wurden mit 0,2 mM (■), 0,3 mM (▲) und 0,4 mM (●) Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM CaCl₂ und 10% DMSO 10 min bei 37 °C vorinkubiert und die Protease-Restaktivität wurde im Aktivitätstest für P1-Proteasen durch Zugabe von 1 nM Subtilisin bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Da dieser Wert sowohl vom Protease- als auch Inhibitortyp abhängt, kann SSTI nicht direkt mit anderen Inhibitoren der SSI-Familie verglichen werden, weil zur Bestimmung von deren K_i-Werten meist Subtilisin BPN' verwendet wurde (Taguchi et al. 1994, Hiraga

et al. 2000). Für den doppelköpfigen Inhibitor ScNPI von *Streptomyces* I-355 beschrieben Hiraga et al. (2000) für Subtilisin BPN' einen K_i von 1,4 nM. SSTI gehört aufgrund seiner Aktivität gegenüber Serin- und Metalloproteasen ebenfalls zu den doppelköpfigen Inhibitoren. Hiraga et al. (2000) verwendeten Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA als Substrat, bei dem die Emission von abgespaltenem 7-Amino-4-methylcoumarin gemessen wird, und damit vermutlich eine noch geringere Subtilisinmenge. Es ist deshalb nicht erstaunlich, dass sich die Inhibitorkonstanten um eine Größenordnung unterscheiden. Bei Taguchi et al. (1994) lagen die K_i -Werte verschiedener SSI gegen Subtilisin BPN' bei Verwendung von Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA zwischen 12 und 58 pM. Eine Inhibitorkonstante im pikomolaren Bereich erscheint für einen proteinogenen Inhibitor extrem niedrig, zumal, wie oben gezeigt, das kleine Peptid die vollständige Inhibierung von Subtilisin verhindert. Eine Differenz von 3 Größenordnungen zu dem hier bestimmten K_i von SSTI legt einen simplen Rechenfehler nahe. Eine solche Unterstellung vorausgesetzt passt SSTI sehr gut zu den anderen SSI-Vertretern.

Trypsin war wegen seiner höheren Konzentration im Messsystem wesentlich stabiler als Subtilisin und benötigte keine Stabilisierung mit 150 mM NaCl. Für 3 μ M Trypsin konnte unter Verwendung von 0,2 – 1 μ M SSTI und 0,2 – 0,4 mM Bz-Arg-pNA ein K_i von ca. 1,49 μ M ermittelt werden (Abb. 4.23). Da sich der Schnittpunkt der Geraden unterhalb der Abszisse befindet, muss es sich in diesem Fall um eine nicht-kompetitive Hemmung der Form $K_{ic} > K_{iu}$ handeln.

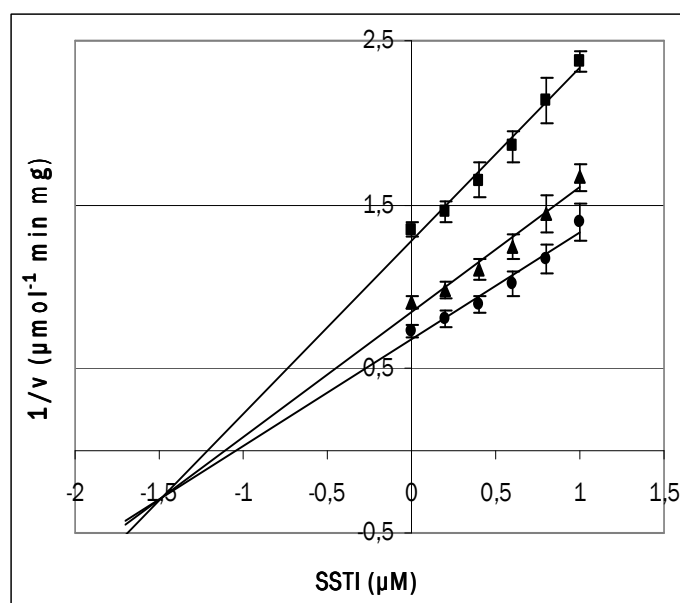


Abb. 4.23: Bestimmung der Inhibitorkonstante K_i von SSTI gegen Trypsin von *Bos taurus*. Verschiedene Konzentrationen an SSTI (0,2 – 1 μ M) wurden mit 0,2 mM (■), 0,3 mM (▲) und 0,4 mM (●) Bz-Arg-pNA in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM CaCl_2 und 40% DMSO 10 min bei 37 °C vorinkubiert und die Protease-Restaktivität wurde im Aktivitätstest für P1-Proteasen durch Zugabe von 3 μ M Trypsin bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Bei Taguchi *et al.* (1994) lagen die K_i verschiedener SSI gegen Trypsin zwischen 21 pM und 1,1 nM, was auch hier Zweifel an der Größenordnung aufkommen lässt. Ein um drei Größenordnungen höherer K_i entspräche wieder gut dem von SSTI mit 1,49 μ M.

Die Einordnung des zwischen 24 und 48 h sekretierten TAMEP-Inhibitors in eine Proteinfamilie wurde bereits von Zotzel (2002) durch Bestimmung der N-terminalen Sequenz vorgenommen. 16 AS hatten eine Identität von ca. 81% mit SIL-V2 von *S. orinoci* (Taguchi *et al.* 1994) und ca. 78% mit SIL-3 von *S. coelicolor* (Taguchi *et al.* 1997). Entsprechend wurde das Protein der Familie der *Streptomyces* Subtilisin Inhibitoren (SSI) zugeordnet. Der Inhibitor konnte jedoch nicht als TGase-Substrat identifiziert werden.

Das in dieser Arbeit gereinigte 14 kDa große und als SSTI bezeichnete TGase-Substrat wurde erneut vom N-Terminus ansequenziert (NMI, Reutlingen), um zu bestätigen, dass es sich um den TAMEP-Inhibitor handelt. In Abb. 4.24 sind die Sequenzen von p14, SSTI von *S. mobaraensis* DSMZ 40847 und dem Subtilisin-Inhibitor von *S. mobaraensis* S-8112 einander gegenübergestellt. Es sollte geklärt werden, ob die Proteine trotz Abstammung von gleichbenannten Organismen Sequenzunterschiede aufweisen. Die Sequenz des Inhibitors vom Stamm S-8112 wurde hinzugezogen, da Taguchi *et al.* 2000 SIL-V6 von *S. mobaraensis* JCM4168 als schwaches TGase-Substrat identifiziert hatten. Gäbe es sequenzielle Unterschiede zwischen den Inhibitoren der Stämme DSMZ 40847 und S-8112, könnten diese auch zu JCM4168 vorhanden sein.

p14 (<i>S. mobaraensis</i> DSMZ 40847) (Zotzel 2002)	QLYAP SALVL TVGQQ D
SSTI (<i>S. mobaraensis</i> DSMZ 40847)	QLYAP SALVL TVGQQ D
Subtilisin-Inhibitor (<i>S. mobaraensis</i> S-8112) (Nio, pers. Mitteilung)	ALYAP SALVL TVGKG V

Abb. 4.24: Sequenzvergleich der N-Termini verschiedener *Streptomyces* Subtilisin Inhibitoren isoliert aus verschiedenen *S. mobaraensis* Stämmen.

Der Sequenzvergleich zeigte, dass es sich bei p14 und SSTI ganz offensichtlich um identische Proteine handelt. Die von Zotzel 2002 für p14 bestimmten Eigenschaften sind entsprechend vollständig auf SSTI übertragbar. Im Gegensatz dazu zeigte die Sequenz des Subtilisin-Inhibitors von *S. mobaraensis* S-8112 wesentliche Unterschiede, alle 3 in der Sequenz von SSTI (p14) enthaltenen Glutamine fehlen. Nur das Glutamin an Position 12 ist durch ein Lysin ersetzt, welches potentiell von der TGase zur Bildung einer Isopeptidbindung mit einem reaktiven Glutamin genutzt werden kann. Die Identität der Sequenzen liegt bei lediglich 75%. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sequenzielle Unterschiede zwischen SSTI und SIL-V6 wahrscheinlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der SDS-PAGE auch die Gelpermeationschromatographie zur Bestimmung des Molekulargewichts von SSTI verwendet. Mit dieser Methode sollte auch geklärt werden, ob der Inhibitor unter nativen Bedingungen in dimerer Form vorliegt, wie bereits bei anderen SSI beschrieben (Murao et al. 1972). Mit den im Methodenteil beschriebenen Eichproteinen wurde für SSTI eine Molmasse von 26,4 kDa bestimmt. Die zum Vergleich aufgetragene TGase hatte eine apparente Molmasse von 36,7 kDa. Diese Ergebnisse legen nahe, dass SSTI unter nativen Bedingungen in dimerer Form vorliegen muss, da die errechnete Molmasse ungefähr doppelt so groß ist, wie die mit SDS-PAGE bestimmten 14 kDa. Der etwas niedrigere GPC-Wert dürfte methodenbedingt sein, wie das Vergleichsprotein TGase nahe legt.

Zur weiteren Charakterisierung von SSTI wurde dessen Temperaturstabilität untersucht. Dazu wurde der Inhibitor bei pH 7,5 und 20 – 100 °C 1 h erwärmt und nach Abkühlen auf ZT mit Subtilisin A (*B. licheniformis*) im Anson-Caein-Test auf Restaktivität untersucht. Das molare Verhältnis I/E betrug ca. 2,4, um eine vollständige Hemmung der Protease bei 20 °C zu erhalten. Der Versuch zeigte, dass SSTI ein hitzeresistentes Protein ist, das noch nach einstündiger Inkubation bei 100 °C 68% Subtilisin inhibiert (Abb. 4.25).

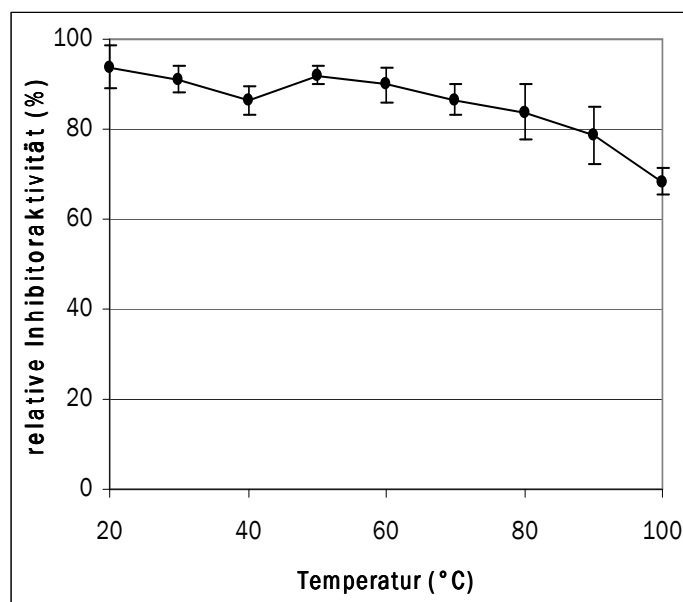


Abb. 4.25: **Thermostabilität von gereinigtem SSTI.** 6,3 µl (0,818 mg/ml) SSTI und 183,7 µl 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl₂ pH 7,5 wurden für 1 h bei 20 – 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf ZT und Zugabe von 10 µl (0,431 mg/ml) Subtilisin erfolgte eine Inkubation für 30 min bei ZT und die Protease-Restaktivität wurde im Anson-Casein-Test bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Des Weiteren wurde die pH-Stabilität von SSTI untersucht. Dazu wurde der Inhibitor 1 h bei ZT im jeweiligen Puffer zwischen pH 2 – 12 inkubiert, und anschließend wurde die Aktivität von 0,92 μ M SSTI gegen 0,39 μ M Subtilisin A (*B. licheniformis*) bei pH 7,5 bestimmt (Abb. 4.26). Der Versuch zeigte, dass SSTI auch pH-resistent ist. Auch eine einstündige Inkubation bei pH 2 – 12 verursachte keine signifikante Abnahme der Inhibitoraktivität. Dabei könnte es sich aber möglicherweise um eine indirekte pH-Stabilität handeln, da für SSI von *Streptomyces albogriseolus* S-3253 schnelle reversible Konformationsänderungen durch pH-Änderungen beschrieben sind (Uehara *et al.* 1983). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass SSI nach 2 min bei pH 1,8 und 25 °C seine Aktivität gegen α -Chymotrypsin vollständig verloren hatte, nach 2-minütiger Inkubation bei neutralem pH jedoch die volle inhibitorische Aktivität wiederhergestellt war.

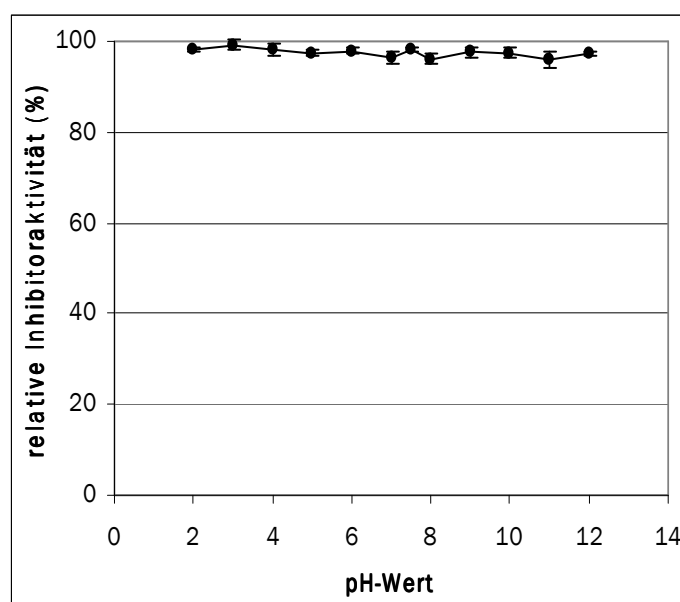


Abb. 4.26: pH-Stabilität von gereinigtem SSTI. Je 16,4 μ g SSTI wurden im jeweiligen 0,1 M Puffer für 1 h bei pH 2 – 12 (0,1 M Glycin-HCl pH 2,0 mit 0,1 M NaCl; 0,1 M Natrium-Acetat pH 3,0 – 5,0; 0,1 M Tris-Acetat pH 6,0; 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 – 9,0; 0,1 M Glycin-NaOH pH 10,0 – 12,0 mit 0,1 M NaCl) und ZT inkubiert, davon 9,5 μ l (5,15 μ g) mit 10 μ l (0,431 mg/ml) Subtilisin und 180,5 μ l 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl_2 pH 7,5 für 30 min bei ZT weiter inkubiert. Anschließend wurde die Protease-Restaktivität im Anson-Casein-Test bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Um weitere Beweise für die Strukturveränderung des Inhibitors während der Kultivierung von *S. mobaraensis* zu sammeln, wurde der pI von SSTI aus 43 – 93 h alten Kulturüberständen bestimmt. Zu erwarten war, dass die Seitenkettenhydrolyse von Glutaminresten oder ein Verschwinden von Lysinen durch intramolekulare Vernetzung zu einer Verringerung der basischen Proteineigenschaften führen sollte. Dabei wurde ein pH-Gradient von 7 – 11 verwendet, weil bei früheren Untersuchungen ein pI von 8,9 gefunden wurde (nicht dargestellt). Es wurde eine signifikante Abnahme des pI von 9,0

auf 8,9 festgestellt, die darauf schließen lässt, dass der Inhibitor bereits in einer sehr frühen Phase der Kultivierung modifiziert wird (Abb. 4.27). Bereits die 43 h alte Probe enthält zweifelsfrei zwei Proteine. Die Kultivierungsdauer von 43 – 93 h und die damit einhergehende Deamidierung von SSTI hatten aber keine Auswirkungen auf die Inhibitoraktivität. Die Hydrolyse von Casein durch Subtilisin im Anson-Casein-Test wurde durch ähnliche Mengen an Protein ungefähr gleich stark inhibiert (nicht dargestellt).

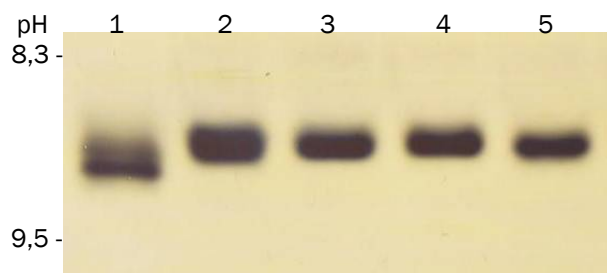


Abb. 4.27: Isoelektrische Fokussierung zum Nachweis der Modifikation von SSTI während der Kultivierung von *S. mobaraensis*. Spuren 1 – 5: aus 43 h; 48 h; 66 h; 73 h und 93 h alten Kulturüberständen gereinigter SSTI.

4.7.2 Eigenschaften von DAIP

DAIP wurde in der AG Fuchsbauer entdeckt (Sarafeddinov et al. 2008). In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *S. mobaraensis* 25 – 30 Stunden benötigt, um eine signifikante Inaktivierung gegenüber der neutralen Metalloprotease Dispase von *B. polymyxa* zu zeigen. Die höchste Inhibitoraktivität wurde nach 72 – 80 h nachgewiesen. Die Molmasse des Inhibitors wurde durch SDS-PAGE und GPC mit 37 kDa bestimmt und ist somit wesentlich größer als die von SSTI. Auch der isoelektrische Punkt liegt mit 7,1 – 7,2 erheblich niedriger. In Abb. 4.28 sind die Ergebnisse zur Untersuchung der Thermostabilität von DAIP dargestellt. 0,61 µM DAIP wurden bei pH 7,5 auf 20 – 90 °C für 5 min, 20 min und 60 min erhitzt. Nach weiterer Inkubation mit 0,32 µM Dispase für 30 min bei ZT wurde die Protease-Restaktivität mit dem Anson-Casein-Test gemessen.

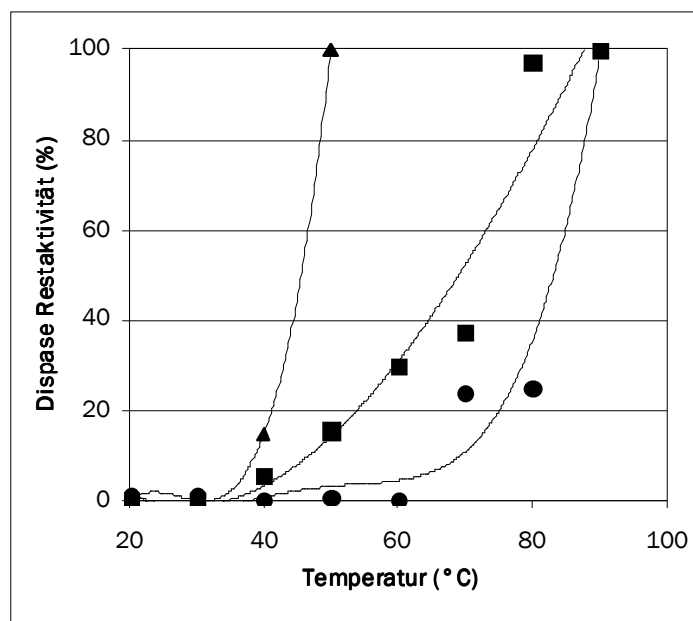


Abb. 4.28: Thermostabilität von gereinigtem DAIP. 30 μ l DAIP (0,3 mg/ml) und 155 μ l 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl_2 pH 7,5 wurden für 5 min (●), 20 min (■) und 60 min (▲) bei 20 – 90°C erhitzt. Nach Zugabe von 15 μ l Dispase (0,3 mg/ml) erfolgte eine Inkubation für 30 min bei ZT und die Protease-Restaktivität wurde im Anson-Casein-Test bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass DAIP thermotolerant aber nicht thermostabil ist. Eine einstündige Erhitzung auf 50°C führte zu vollständigem Verlust der inhibitorischen Aktivität. Bei kürzerer Dauer wurden auch Temperaturen von 70°C (20 min) und 80°C (5 min) toleriert, führten aber zur Abnahme der Inhibitoraktivität um ca. 25 – 40%. In gelelektrophoretischen Untersuchungen mit gereinigtem DAIP wurde auch gezeigt, dass er bei Temperaturen über 60°C nicht nur hitzedenaturiert, sondern nach 5 min auch abgebaut wird, wodurch neue Proteinbanden unterhalb von 37 kDa auftreten, die anfangs fälschlicherweise für Verunreinigungen gehalten wurden. Da saure Hydrolyse durch eine pH-Verschiebung während des Erhitzens durch vergleichende Versuche unter Verwendung eines SDS-Auftragspuffers mit pH 8,0 ausgeschlossen werden konnte, wurden DAIP-enthaltende Denaturierungsansätze nur 1 min bei 90°C erhitzt, um Abbauprodukte zu vermeiden.

Um DAIP in eine Proteinfamilie einordnen zu können, wurde die Aminosäuresequenz benötigt. Nach tryptischem Verdau erfolgte eine massenspektrometrische Analyse der erhaltenen Peptide. Es konnten allerdings nur die ersten 3 AS des N-Terminus bestimmt werden, weshalb diese Sequenz im Rahmen dieser Arbeit mittels Edman-Abbau erneut bestimmt wurde. In Tab. 4.2 sind die bisher erhaltenen Sequenzdaten zusammengefasst.

Tab. 4.2: Partielle Sequenzen von DAIP von *S. mobaraensis* erhalten durch Edman-Abbau und Massenspektrometrie nach Trypsin-Verdau.

Peptide	Peptidmasse	Sequenz†
N-terminales Peptid		ADSTS GXRAP SXTKV TGDGA VTF
Peptide des Trypsin-Verdau		
A	1334,741	SNLFAASVSALR
B	1483,859	(k/q)DGDACDR...
C	1554,799	...GDV...
D	1791,922	...NAHDGLSAGLG...
E	2215,168	(vl)F(k/q)SPNAAEVLP(dw...h)R
F	2351,159	(k/q)ADV(k/q)SVT(k/q)ADTSDYL(avnglr)
G	2717	...GSS...
H		...LSVE...

† AS die nicht sicher bestimmt werden konnten, sind klein gedruckt und in Klammern. X könnte Cystein, Tryptophan oder eine modifizierte AS sein.

Der Sequenzvergleich mit den in Datenbanken vorhandenen Proteinen zeigte, dass DAIP ein unbekanntes, neues Protein ist.

Eine halbmaximale Inhibition bei einem sehr niedrigen I/E-Verhältnis von 0,037 weist bereits auf einen besonderen Hemmtyp hin. Bei 0,1 wurde Dispase vollständig durch DAIP inaktiviert (Abb. 4.29). Außerdem wurde beobachtet, dass die Inhibitorwirkung von DAIP aus älteren Kulturüberständen von 73 und 93 h um das 5 – 6fache reduziert wurde.

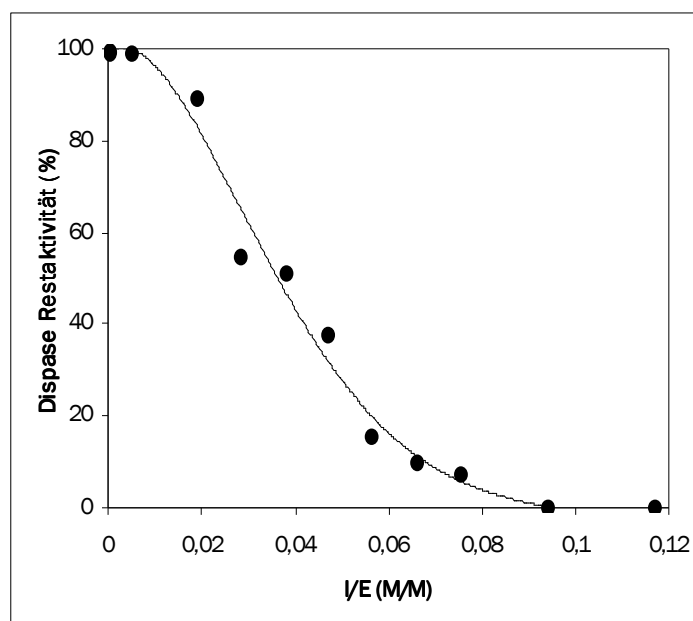


Abb. 4.29: Effekt von gereinigtem DAIP auf die Aktivität von Dispase. 15 µl (0,291 mg/ml) Dispase in 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl₂ pH 7,5 und verschiedene Konzentrationen an DAIP wurden für 30 min bei ZT inkubiert und die Protease-Restaktivität wurde im Anson-Casein-Test bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt.

Neben der bereits bekannten Aktivität von DAIP gegen Dispase wurden auch Messungen zur Inhibition weiterer Proteasen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Metalloproteasen Collagenase von *Clostridium histolyticum*, der Serinproteasen Trypsin und α -Chymotrypsin von *Bos taurus* und Subtilisin von *Bacillus licheniformis* sowie der Cysteinproteasen Bromelain aus *Ananas comosus* und Papain aus *Carica papaya* nicht beeinträchtigt werden. Messungen zur Aktivität von DAIP gegen die Metalloproteasen Thermolysin von *Bacillus thermoproteolyticus* rokko und TAMEP von *S. mobaraensis* wurden mit Dabcyl-Ser-Phe-EDANS im Fluoreszenz-Aktivitätstest durchgeführt (Weimer et al. 2006). Kontrollmessungen mit Dispase bestätigten die Ergebnisse der vorangegangenen Inhibierungsexperimente. TAMEP wurde nicht von DAIP inhibiert. Thermolysin wurde gehemmt, aber das I/E-Verhältnis lag deutlich höher als bei Dispase. Bei einem Verhältnis von 1,98 lag die Restaktivität bei 54%.

Zum besseren Verständnis des Wirkmechanismus von DAIP wurde die molekulare Interaktion mit Dispase mittels GPC untersucht. Dazu wurden Dispase und verschiedene Dispase/DAIP-Mischungen mittels GPC aufgetrennt (Abb. 4.30).

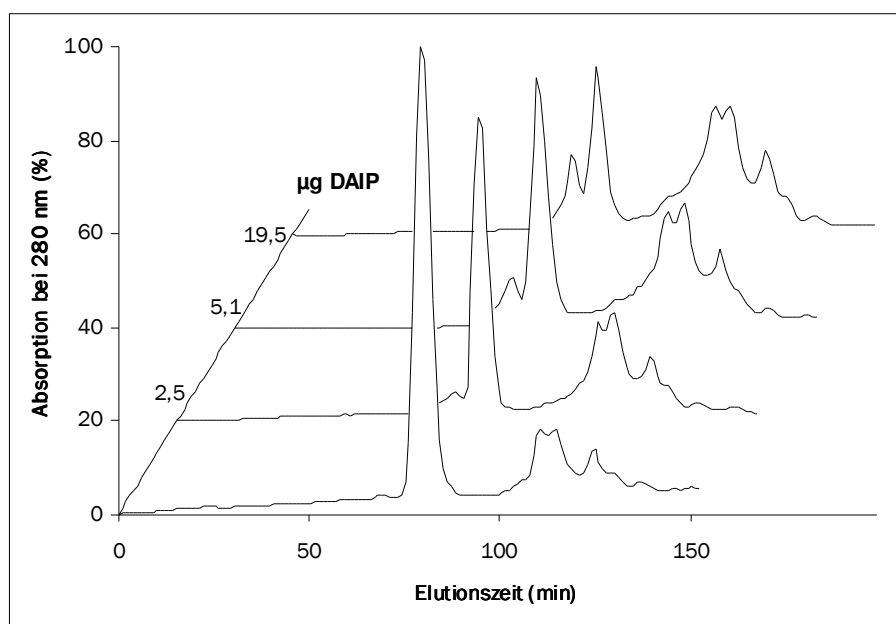


Abb. 4.30: Autolyse von Dispase in Gegenwart von DAIP. 105 µg Dispase und die angegebenen Mengen DAIP in 50 mM Tris-HCl mit 2 mM CaCl_2 pH 7,5 und 150 mM NaCl wurden gemischt (Endvolumen 1 ml) und mittels Größenausschlusschromatographie über eine Superdex 75 Säule aufgetrennt.

Dispase (35 kDa) eluierte nach 78 min von der Säule, gefolgt von Fragmenten nach 105 – 140 min. Die Auftrennung der Mischungen von Dispase mit verschiedenen Konzentrationen an DAIP zeigte keine hochmolekularen Aggregate, die auf einen Enzym-Inhibitor-Komplex schließen lassen, aber DAIP, der aufgrund seiner etwas höheren

Molmasse (37 kDa) früher von der Säule eluierte. Bereits bei Zugabe von 2,5 µg Inhibitor ist deutlich eine Abnahme des Dispase-Hauptgipfels und eine Zunahme der Abbauprodukte zu erkennen. Dieser Effekt konnte durch Erhöhung der DAIP-Konzentration in der Mischung noch verstärkt werden. Da mit den Kontrollansätzen im Anson-Casein-Test bereits gezeigt werden konnte, dass es sich bei DAIP nicht um eine Protease handelt, und auch Hämoglobin, Myoglobin und Myosin resistent gegen Abbau durch das Protein waren (nicht dargestellt), lag die Vermutung nahe, dass es den Selbstabbau von Dispase induziert und wurde daher Dispase-Autolyse induzierendes Protein genannt. Der Inhibitor selbst wird aber nicht von der Protease angegriffen, dazu ist nur Thermolysin in der Lage, welches aber selbst, wie oben beschrieben, inhibiert wird, indem es ebenfalls autolysiert (nicht dargestellt).

Da Dispase eine Metalloprotease ist, könnte DAIP aber auch als Metall-Bindeprotein wirken, welches das Enzym durch Entzug essentieller Metallionen aus dem Aktivzentrum inaktiviert. Dem widersprechen die Metalloproteasen Collagenase und TAMEP, die nicht von DAIP inhibiert werden (nicht dargestellt). Für die weitere Aufklärung des Wirkmechanismus wurde daher die Inhibierung von Dispase in Gegenwart von 0 – 10 mM Ca^{2+} , welches z. B. Thermolysin stabilisiert, und 0 – 500 µM Zn^{2+} , welches wichtig für die Katalyse ist, untersucht. DAIP wurde dafür nach einer Methode von Holmquist & Vallee (1974) mit dem spezifischen Komplexbildner 1,10-Phenanthrolin von unspezifisch gebundenen Metallen befreit, um deren Einfluss auszuschließen. Dies erfolgte durch dreimalige Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 2 mM 1,10-Phenanthrolin und anschließende dreimalige Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Die halbmaximale Inhibition von Dispase mit metallfreiem DAIP entsprach der von unbehandeltem DAIP. Bei einer konstanten Calciumkonzentration von 2 mM, welche auch unter normalen Anson-Casein-Test-Bedingungen enthalten ist, und variierendem Zn^{2+} zwischen 100 – 500 µM, 20 – 100 µM und 0 – 10 µM wurde eine Senkung der Dispaseaktivität um die Hälfte bei 500 µM und eine kontinuierliche Abnahme zwischen 20 und 100 µM Zn^{2+} gemessen. Nur zwischen 0 – 5 µM war der Einfluss von Zink auf die Aktivität von Dispase unerheblich. Im Gegensatz dazu wurde DAIP durch niedrige Zinkkonzentrationen bis 5 µM in seiner Aktivität beeinflusst, aber nur, wenn das Verhältnis I/E unter 0,1 lag. (Abb. 4.31).

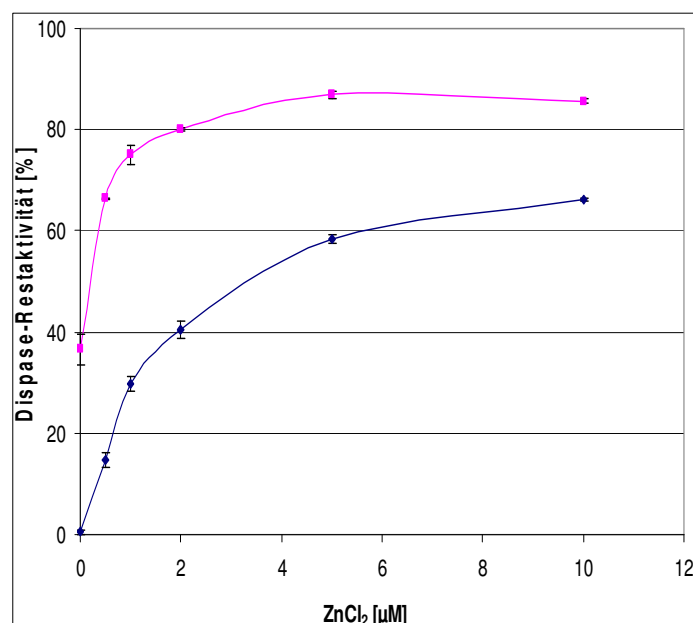


Abb. 4.31: Einfluss von Zn^{2+} auf die Aktivität von DAIP. 2,6 μ g Dispase (186 nM) wurden mit 99,8 ng (6,7 nM; pink) bzw. 199,5 ng (13,5 nM; blau) DAIP in 0,1 M Tris-HCl pH mit 2 mM $CaCl_2$ 7,5 und 0 – 10 μ M $ZnCl_2$ für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Dispase-Restaktivität in drei unabhängigen Messungen im Anson-Casein-Test mit 10 mg/ml Casein bestimmt.

Bei konstanter Zinkkonzentration von 10 μ M und Variation von Calcium zwischen 0 und 10 mM zeigte sich bei einem I/E-Verhältnis von 0,036 ein Anstieg der Dispase-Restaktivität von 60% bei 0 mM Ca^{2+} auf 86% bei 2 mM. Bei einem I/E-Verhältnis von 0,073 stieg die Restaktivität von 10% bei 0 mM Ca^{2+} auf 71% bei 5 mM. Weitere Steigerungen der Calciumkonzentration hatten keinen Einfluss mehr auf die DAIP-Aktivität. Die Ergebnisse legen nahe, dass die für die Aktivität essentiellen Ionen Dispase stabilisieren, indem die im Gleichgewicht vorliegende Apoenzymmenge und damit auch die DAIP-Aktivität verringert werden. Wahrscheinlich katalysiert DAIP die Bildung Autolyse-sensitiver Konformationen von Dispase, was bei einem Zink- und Calcium-freien Protein (Apoenzym) energetisch besonders günstig sein dürfte. Autolyse-sensitive Konformationen wurden erstmals bei Thermolysin beobachtet, wenn das Enzym in Gegenwart von EDTA Teile der stabilisierenden Kationen verloren hatte (Holmquist & Vallee 1974).

4.8 Substratmodulatoren der Transglutaminase

4.8.1 Entdeckung

In Kap. 4.5 wurde bereits beschrieben, dass SSTI und DAIP aus 48 h alten Kulturen von *S. mobaraensis* durch enzymatische Biotinylierung mit ZQGB bzw. MBC als Lysin- und

Glutaminsubstrate identifiziert werden konnten. Jedoch war die Markierung der Glutamine oft nicht möglich oder schwach. Auch Versuche zur Homopolymerisation von SSTI bzw. DAIP durch TGase sowie zur Heteropolymerisation von SSTI mit Dimethylcasein scheiterten. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Kenntnisse über die Hydrolyse der Glutamine während der Kultivierung von *S. mobaraensis* vorlagen, wurde vermutet, dass die möglichen hydrophoben Eigenschaften der Substratproteine die Zugänglichkeit der TGase zum Substrat im wässrigen *in vitro* System stören und somit die Markierung oder Vernetzung behindern könnten. Die Glutamine könnten besonders betroffen sein, da der erste Schritt der TGase-Reaktion der nukleophile Angriff des Thiolations von Cys⁶⁴ auf einen Acyldonor, also die Seitenkette eines Glutamins, ist. Ist dieser im wässrigen Milieu durch die Hydrophobizität des Substratproteins schwer zugänglich, kommt es nicht zur Ausbildung des Acyl-Enzym-Komplexes und Markierung oder Vernetzung der Proteine bleiben aus. Falls es dennoch zu einer geringen Polymerisation kommt, würden die Produkte noch mehr dazu neigen, an die Wandung der Polypropylen-Reagiergefäße zu adsorbieren.

Erste Versuche, die Substratproteine von TGase während Markierungs- und Vernetzungsreaktion besser in Lösung zu halten, wurden mit 48 h altem SSTI und verschiedenen Detergenzien durchgeführt. Die Reaktionszeit wurde bei den ersten Vernetzungsansätzen auf 24 h ausgedehnt, um eine vollständige Umsetzung zu erhalten. Die Inkubation erfolgte in diesem Fall bei ZT, um einen Aktivitätsverlust der TGase, der bei höheren Temperaturen auftreten könnte, zu vermeiden. Zusätzlich wurde eine niedrige Detergenzkonzentration gewählt, um die strukturelle Integrität von SSTI möglichst zu bewahren. Mit jeweils 0,1% (w/v) Tween20, Tween80, TritonX100, Octyl- β -D-glucopyranosid, Dodecyl- β -D-maltosid, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS) und Dimethylsulfoxid (DMSO) im Vernetzungsansatz konnte trotz sehr empfindlicher Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele kein Unterschied zur Kontrolle beobachtet werden. Wurde jedoch die Lipoaminosäure N-Lauroylsarcosin (LS) in der gleichen Konzentration zugefügt und die Ansätze unter gleichen Bedingungen inkubiert, zeigte sich die Entstehung von zwei neuen Banden bei ca. 25 und 32 kDa, die eindeutig Produkte der Umsetzung von SSTI durch TGase sein mussten (Abb. 4.32). Es konnte jedoch keine vollständige Vernetzung erreicht werden.

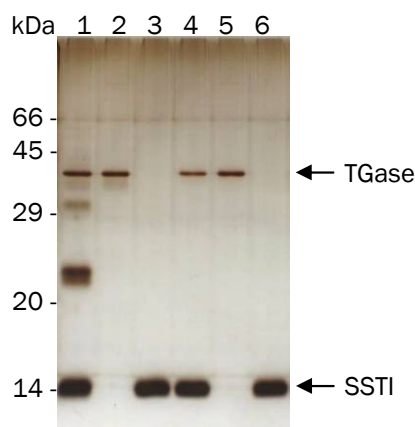


Abb. 4.32: Vernetzungsreaktion von gereinigtem SSTI aus 48 h altem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* durch TGase mit und ohne 0,1% N-Lauroylsarcosin. Je 2,4 µg SSTI wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 mit und ohne 0,1% LS und 13,75 mU TGase üN bei ZT inkubiert. Spuren 1 – 3: Ansätze mit 0,1% LS: SSTI + TGase; TGase; SSTI; Spuren 4 – 6: Ansätze ohne LS: SSTI + TGase; TGase; SSTI.

Zur Überprüfung einer möglichen Temperaturabhängigkeit der Vernetzungsreaktion von SSTI durch TGase in Gegenwart von 0,1% LS und einer damit verbundenen möglichen Steigerung der Ausbeute an SSTI-Vernetzungsprodukten wurden die Vernetzungsansätze 1 h zwischen 30 und 70 °C inkubiert. Als Kontrolle diente ein bei ZT inkubierter Ansatz. Dabei zeigten sich die 25 und 32 kDa großen Banden nach Inkubation bei ZT und 30 – 40 °C in gleichbleibender Stärke, es konnte jedoch auch in diesem Versuch keine vollständige Vernetzung erzielt werden. Höhere Temperaturen führten nicht zu einer Vernetzung von SSTI, sondern es zeigte sich bei 50 °C eine zweite Bande knapp unterhalb der TGase, bei der es sich um ein Abbauprodukt des Enzyms handeln könnte. Bei 60 °C wurde zusätzlich die Dimerisierung von TGase beobachtet (nicht dargestellt). Basierend auf diesen Ergebnissen sollten nachfolgende Vernetzungs- und Markierungsversuche beim Temperaturoptimum der TGase von 37 °C stattfinden, wobei die Zeitabhängigkeit der Reaktionen genauer untersucht werden musste.

4.8.2 Einfluss der Modulatoren auf Transglutaminase und deren Substrate

Zuerst sollte der Einfluss von LS auf SSTI und TGase näher bestimmt werden, da es sich dabei neben einer Lipoaminosäure auch um ein Detergenz handelt, welches durch Eindringen in den hydrophoben Kern der Proteine und dadurch ausgelöste Strukturveränderungen unter anderem zum Verlust der Inhibitoraktivität von SSTI führen könnte. Wäre dies der Fall, könnte man von einer Denaturierung des Inhibitors und unphysiologischen Exponierung von Lysin- und Glutaminresten ausgehen, durch die die SSTI-Vernetzbarkeit gefördert wird. SSTI wäre dann kein physiologisches TGase-Substrat. Ein Verlust der TGase-Aktivität war aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse eher

unwahrscheinlich. LS könnte aber die Enzymaktivität steigern und so die Vernetzung von SSTI begünstigen. Um das Verhalten beider Proteine zu verstehen, wurden SSTI (Aktivität gegen Subtilisin A im Anson-Casein-Test) und TGase (Hydroxamat-Test) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von LS untersucht. Der Inhibitor und Subtilisin wurden mit 0 – 10,2 mM (0,3%) LS bei pH 7,5 für 30 min bei ZT inkubiert. Anschließend wurde die proteolytische Restaktivität durch Abbau von Casein gemessen. Analog dazu wurde die Aktivität von Subtilisin in Gegenwart von 0 – 10,2 mM LS ohne SSTI bestimmt, um den Einfluss auf die Protease zu ermitteln (nicht dargestellt) und die relative Inhibitoraktivität berechnen zu können (Abb. 4.33).

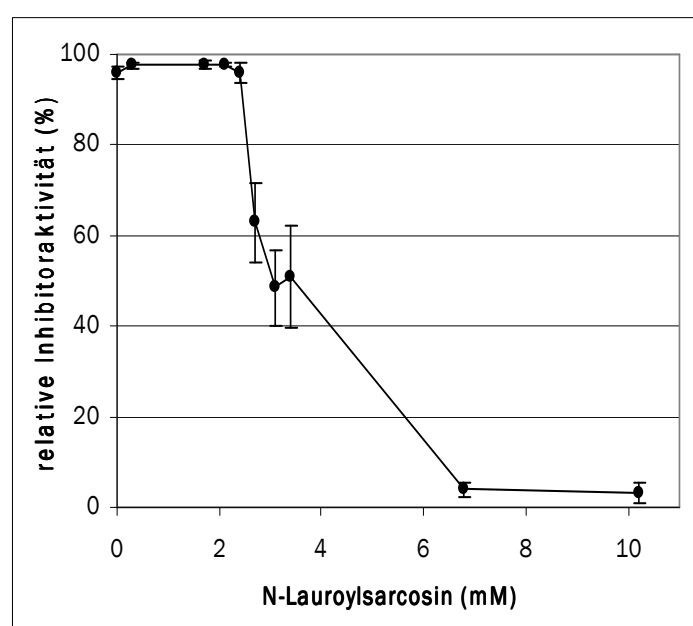


Abb. 4.33: Effekt von N-Lauroylsarcosin auf die Aktivität von SSTI. 6,3 μ l (0,818 mg/ml) SSTI, 10 μ l (0,431 mg/ml) Subtilisin und 183,7 μ l 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl_2 pH 7,5 und 0 – 10,2 mM LS wurden für 30 min bei ZT inkubiert, die Protease-Restaktivität wurde im Anson-Casein-Test bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt und durch Abzug des Effekts von LS auf die Subtilisin-Aktivität korrigiert.

Bei Subtilisin konnte bei LS-Konzentrationen von 1,7 – 3,1 mM ein signifikanter Anstieg der Aktivität um 4 – 5% festgestellt werden. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration kam es zu einer Abnahme der proteolytischen Aktivität um bis zu 16,2%, was auf eine Veränderung der Struktur von Subtilisin hindeutet. Demgegenüber zeigte SSTI bis zu einer Konzentration von 2,4 mM keine signifikante Veränderung der Aktivität. Jedoch kam es bei 2,7 – 3,4 mM LS im Ansatz zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität von SSTI um bis zu 50%. Starke Messwertschwankungen in diesem Bereich weisen auf unterschiedlich aktive Konformationsisomere hin. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration wurde die Aktivität von SSTI vollständig von LS gehemmt. Die

Konformationsänderungen des Inhibitors waren bei diesen Mengen von LS offensichtlich so schwerwiegend, dass die Ausbildung eines Inhibitor-Komplexes mit Subtilisin nicht mehr länger möglich war. Das Ergebnis zeigte, dass das im Vorversuch eingesetzte LS von 0,1% (3,4 mM) bereits zu hoch konzentriert war und die Obergrenze für neue Vernetzungsexperimente bei 2,4 mM LS lag.

Die Auswirkungen von LS auf TGase wurden ebenfalls in Gegenwart von 0 – 10,2 mM LS untersucht. Nach Vorinkubation bei pH 6,0 und 37 °C für 10 min erfolgte die Messung der Restaktivität mit dem Hydroxamat-Test (Abb. 4.34).

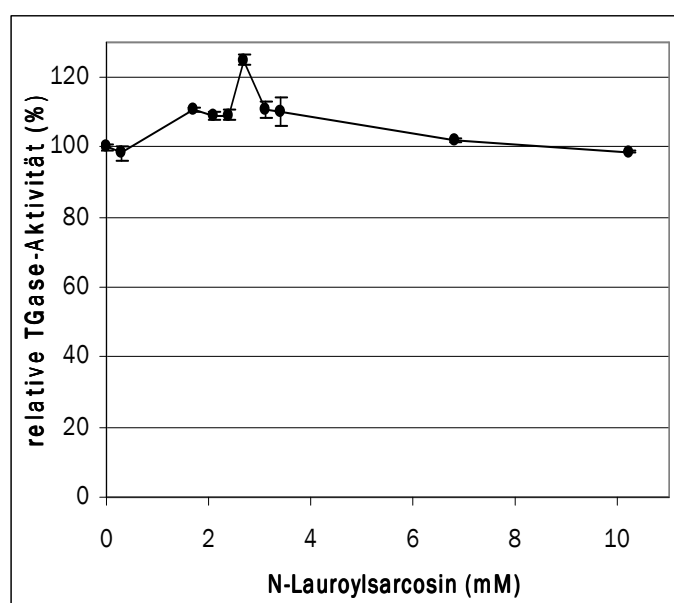


Abb. 4.34: Effekt von N-Lauroylsarcosin auf die Aktivität von TGase. 10 µl (11 U/ml) TGase und 40 µl 50 mM Tris-Acetat pH 6,0 mit 0 – 10,2 mM LS wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert und die TGase-Aktivität wurde dreifach im Hydroxamat-Test bestimmt.

Die Untersuchung zeigte, dass LS in den Mengen, die die Funktion von SSTI nicht beeinträchtigen, die Aktivität von TGase noch steigern kann. Der positive Effekt erreichte ein Maximum bei 3,5 mM. Höhere Konzentrationen hoben die Wirkung wieder auf, wobei 10,2 mM LS noch keinen signifikanten Aktivitätsverlust verursachten. Die in den folgenden Vernetzungs- und Markierungsversuche gewählte LS-Konzentration von 2,4 mM hatte eine Aktivitätssteigerung von ca. 9% zur Folge und dürfte für die Ergebnisse von geringerer Bedeutung sein.

Taguchi *et al.* (2000) berichteten bereits früher, dass SIL-V6 von *S. mobaraensis* JCM4168 ein schwaches TGase-Substrat sei. Jedoch lässt der Bericht Zweifel über die Substrateigenschaften aufkommen, weil die Homopolymerisation mit TGase nicht gelang.

Außerdem wurde für den Nachweis der Substrateigenschaften als Kosubstrat β -Casein verwendet, das die Identifizierung der Reaktionszentren (Glutamin- oder Lysinseitenketten) nicht zulässt. Die angewandte Methodik ließ auch nur eine grobe Klassifizierung in „+“, „++“ und „+++“ Substrate (SIL-V6 erhielt die „+“ Bewertung) anhand der Menge der Kopplungsprodukte zu, die durch Western Blot bestimmt wurden. SIL-V6 wurde zudem in Gegenwart von 10 mM DTT ein besseres TGase-Substrat, wie die Erhöhung der Bewertung von „+“ auf „++“ nahe legt. Es war deshalb notwendig, auch den Einfluss von DTT auf die Funktion von SSTI zu untersuchen (Abb. 4.35). Des Weiteren sollte geprüft werden, wie verschiedene DTT-Mengen bei konstantem LS von 2,4 mM auf beide Proteine wirken, um diese ggf. auch in Vernetzungs- und Markierungsreaktionen einsetzen zu können (Abb. 4.36). Die Aktivitätsmessungen erfolgten wie zuvor beschrieben, d. h., dass auch die Aktivität von Subtilisin in Gegenwart von 0 – 20 mM DTT ohne Inhibitor für die Berechnung der tatsächlichen Inhibitoraktivität bestimmt wurde (nicht dargestellt).

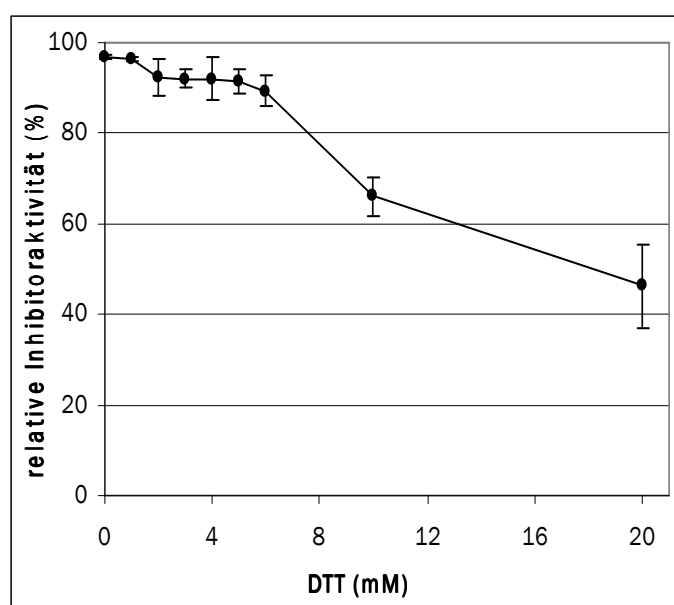


Abb. 4.35: Effekt von DTT auf die Aktivität von SSTI. 6,3 μ l (0,818 mg/ml) SSTI, 10 μ l (0,431 mg/ml) Subtilisin und 183,7 μ l 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl_2 pH 7,5 und 0 – 20 mM DTT wurden für 30 min bei ZT inkubiert, die Protease-Restaktivität wurde im Anson-Casein-Test bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt und durch Abzug des Effekts von DTT auf die Subtilisin-Aktivität korrigiert.

DTT führte bis 6 mM zu einer Steigerung der Subtilisin-Aktivität um bis zu 5%, die bei 10 mM DTT 18% erreichte. Auf SSTI hatte DTT einen aktivitätssenkenden Einfluss. Ab 5 mM DTT im Ansatz kam es zu einem signifikanten Verlust der Aktivität um ca. 5%, welcher bis auf 54% bei 20 mM anstieg (Abb. 4.35). Offensichtlich wurden durch das Reduktionsmittel essentielle Disulfidbrücken des Inhibitors geöffnet, was nachfolgend

Konformationsänderungen und Aktivitätsverlust mit sich brachte. Die von Taguchi *et al.* (2000) beobachtete Verstärkung der Substrateigenschaften von SIL-V6 durch 10 mM DTT dürfte deshalb aller Wahrscheinlichkeit nach durch Denaturierung des Inhibitors verursacht sein.

Für die Kontrollmessungen der TGase-Aktivität wurden nur 0 – 6 mM DTT eingesetzt, da höhere Konzentrationen bei SSTI nicht verwendet werden konnten. Das reduzierende Agens steigerte die Aktivität des Enzyms um bis zu 23%, was möglicherweise auf einen Schutz des essentiellen Cysteins im Aktivzentrum durch Abfangen des in der Reaktionsmischung gelösten Sauerstoffs zurückzuführen ist (nicht dargestellt).

Für die Messungen der SSTI- und Subtilisin-Aktivität bei konstantem LS von 2,4 mM im Ansatz wurde die DTT-Konzentration ebenfalls zwischen 0 – 6 mM variiert. In Abb. 4.36 ist der Einfluss auf die Aktivität von SSTI dargestellt.

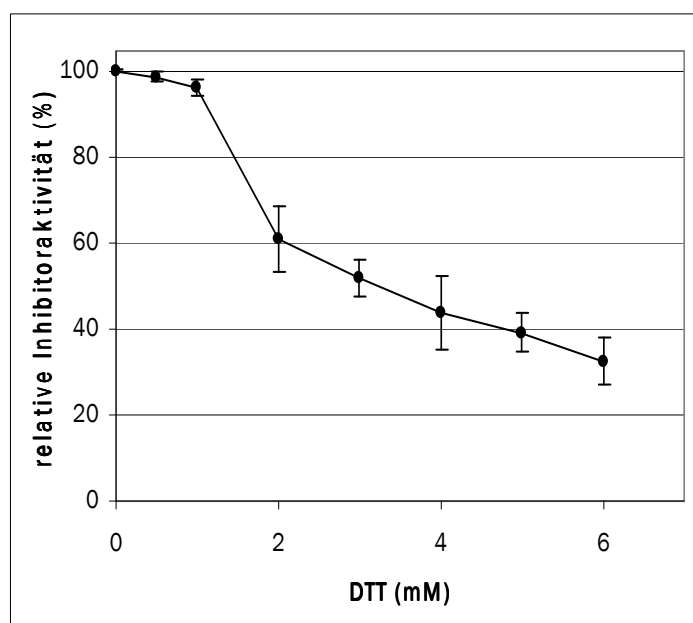


Abb. 4.36: Effekt von DTT auf die Aktivität von SSTI bei konstanten 2,4 mM N-Lauroylsarcosin. 6,3 μ l (0,818 mg/ml) SSTI, 10 μ l (0,431 mg/ml) Subtilisin und 183,7 μ l 0,1 M Tris-HCl mit 2 mM CaCl_2 pH 7,5, 2,4 mM LS und 0 – 6 mM DTT wurden für 30 min bei ZT inkubiert, die Protease-Restaktivität wurde im Anson-Casein-Test bestimmt. Die Messdaten wurden in mindestens drei unabhängigen Messreihen ermittelt und durch Abzug des Effekts von DTT bei konstantem LS von 2,4 mM auf die Subtilisin-Aktivität korrigiert.

Wurde Subtilisin mit 2,4 mM LS und zusätzlich 0 – 6 mM DTT inkubiert, führte dies zu einer signifikanten Zunahme der Proteaseaktivität um bis zu 12%. Im Gegensatz dazu kam es bei SSTI durch Zugabe von DTT zu dieser, den Inhibitor nicht beeinflussenden LS-Konzentration interessanterweise bereits bei 1 mM zur signifikanten Abnahme der

Aktivität um ca. 4%. Wurde die Konzentration auf 2 – 6 mM erhöht, sank die Inhibitoraktivität um ca. 40 – 68%.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass bis zu 3 mM N-Lauroylsarcosin auf TGase und Subtilisin einen aktivitätssteigernden Effekt hatten. Höhere Konzentrationen hatten bei TGase keine weiteren Auswirkungen, bei Subtilisin kam es zur Abnahme der proteolytischen Aktivität. DTT steigerte die Aktivität beider Enzyme. Die Kombination von LS und DTT in niedrigen Konzentrationen von 2,4 mM und bis 6 mM führte zu einer Steigerung der Proteaseaktivität. Im Unterschied dazu verlor SSTI sowohl mit LS als auch mit DTT ab einer Konzentration von 2,7 bzw. 6 mM Inhibitoraktivität gegenüber Subtilisin. Die Wirkung von DTT wurde durch 2,4 mM LS dramatisch verstärkt, sodass es bereits ab 1 mM DTT zu einer Senkung der inhibitorischen Aktivität kam. Deshalb wurde DTT in den folgenden Markierungs- und Vernetzungsuntersuchungen nicht verwendet.

Die Unterscheidung zwischen reaktiven Glutamin- und Lysinresten wurde, wie bereits in Kap. 4.6 erwähnt, mit dem biotinylierten Amin MBC und dem biotinylierten Peptid ZQGB durchgeführt. Zunächst wurde aus 48 h altem KÜ isolierter SSTI bei pH 7,5 mit 2,4 mM LS für 2 h bei 37°C mit beiden Markern und TGase inkubiert. In Abb. 4.37 ist das Ergebnis der TGase-katalysierten Markierung von Glutamin- und Lysinresten dargestellt.

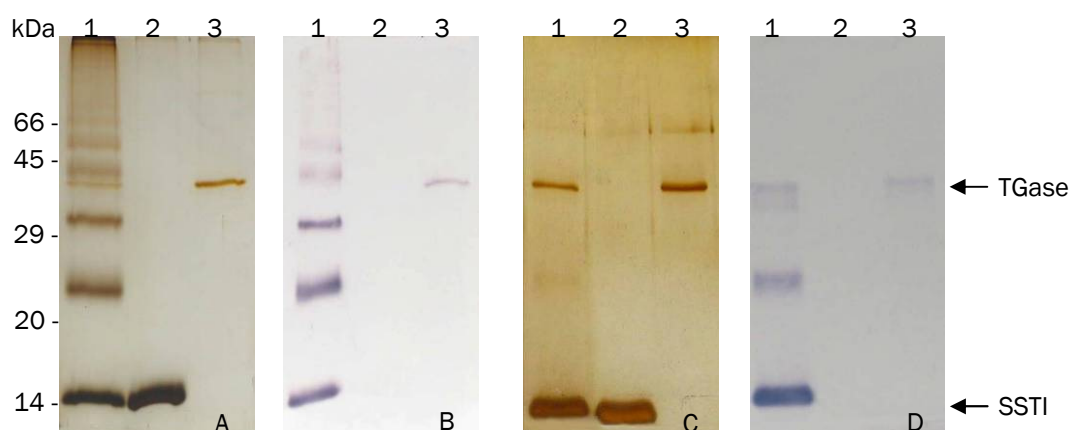


Abb. 4.37: Western Blot-Analyse der TGase-vermittelten Markierung von 48 h altem, gereinigtem SSTI in Gegenwart von 2,4 mM N-Lauroylsarcosin mit biotinylierten Markern. Für die Markierung von reaktiven Lysinen mit 125 µM ZQGB (A, B) und reaktiven Glutaminen mit 2 mM MBC (C, D) wurden 6,1 µg SSTI in Gegenwart von 2,4 mM LS in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 27,5 mM TGase für 2 h bei 37°C inkubiert. (A, C) Silbergefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele. (B, D) Unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembranen. Spur 1: SSTI + TGase; Spur 2: SSTI; Spur 3: TGase.

In Gegenwart von 2,4 mM LS zeigte sich, dass das kompetitiv inhibierende Markierungsreagenz ZQGB die enzymatische Quervernetzung von SSTI nicht verhindern

konnte (A, B). Es entstanden oligomere Proteine mit den apparenten Molmassen von ca. 25 kDa, 32 kDa, 42 kDa und 56 kDa sowie Polymere, die ein Kontinuum am Einlauf zum Trenngel bildeten. Diese wurden in Abwesenheit von LS nicht beobachtet (Abb. 4.13, Spur 3). Die Markierung der Oligomere weist jedoch auf einen Abbruch der Vernetzung durch das Dipeptid hin (B). Im Gegensatz dazu konnte die Quervernetzung durch MBC fast vollständig unterdrückt werden. Im silbergefärbten Polyacrylamid-Gel war nur eine schwache Bande bei ca. 25 kDa zu erkennen (C). In diesem Fall weist der Einbau des biotinylierten Markers ebenfalls auf einen Abbruch der enzymatischen Polymerisationsreaktion hin (D). Die beträchtliche Steigerung der MBC-Markierung durch LS weist auf eine Aktivierung kryptischer Glutaminresten durch LS hin. Des Weiteren konnte der Einbau beider Marker in TGase unter den verwendeten Bedingungen nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass LS auch Glutamine und Lysine des Vernetzungsenzyms zugänglich macht.

Durch einen zeitabhängigen Vernetzungsversuch von SSTI in Gegenwart von 2,4 mM LS sollten weitere Beweise für dessen Wirkung als Substratmodulator von Proteinen gesammelt werden. Für die Vernetzung wurde SSTI aus einer 48 h alten Kultur für bis zu 8 h bei 37 °C und pH 7,5 mit TGase inkubiert. Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und nach Inkubation mit SSTI-spezifischen Antikörpern durch alkalische Phosphatase-konjugierte Zweitantikörper sichtbar gemacht. Das Ergebnis der zeitaufgelösten TGase-katalysierten Vernetzung von SSTI ist in Abb. 4.38 dargestellt.

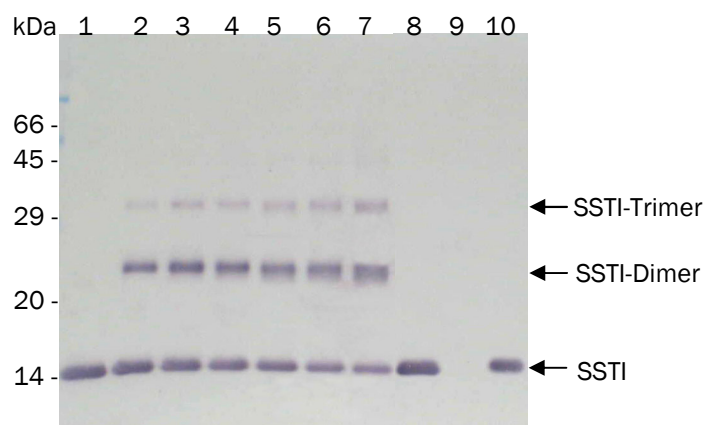


Abb. 4.38: Vernetzung von SSTI aus 48 h altem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* durch TGase in Gegenwart von 2,4 mM N-Lauroylsarcosin. Je 4,5 µg SSTI wurden in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 2,4 mM LS und 27,5 mU TGase bis zu 8 h bei 37 °C inkubiert. Immunchemisch, nach Inkubation mit SSTI-spezifischen Antikörpern, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1 – 7: SSTI + TGase nach 0 ' ; 10 ' ; 30 ' ; 60 ' ; 120 ' ; 240 ' und 480 ' ; Spur 8: SSTI; Spur 9: TGase; Spur 10: SSTI + TGase ohne LS 480 ' .

Während der Inkubation von gereinigtem SSTI mit TGase in Gegenwart von 2,4 mM LS konnten bereits nach 10 min zwei zusätzliche Banden bei ca. 25 und 32 kDa mit SSTI-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf bis 8 h zeigte sich eine Verstärkung der SSTI-Di- und Trimere und eine Abnahme der monomeren Bande (Spur 7), ohne dass es jedoch zu einer vollständigen Polymerisation kam. Bei der Kontrolle ohne LS und TGase, konnten auch nach 8 h keine SSTI-Aggregate beobachtet werden (Spur 10).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch den Einsatz von geringen, die Aktivität des Inhibitors nicht beeinflussenden Konzentrationen an N-Lauroylsarcosin eine Markierung von Glutaminresten und die Vernetzung zu SSTI-Oligomeren durch TGase möglich wird. Dieser Effekt ist vermutlich nicht auf die Steigerung der TGase-Aktivität zurückzuführen, da diese bei 2,4 mM nur ca. 9% betrug, sondern auf eine Modulation von SSTI durch LS, indem wahrscheinlich kryptische Glutamine exponiert werden.

In anfänglichen Untersuchungen konnten auch bei DAIP, ähnlich wie bei SSTI, keine markierten Glutamine und DAIP-Polymere nachgewiesen werden. Daher wurde, basierend auf den Ergebnissen mit SSTI, zuerst in Markierungsversuchen bei pH 7,5 mit 0 – 3,4 mM LS für 2 h bei 37 °C versucht die optimale Konzentration für dieses Protein zu bestimmen. In Abb. 4.39 sind die Ergebnisse der TGase-katalysierten Reaktion mit ZQGB (A) und MBC (B) dargestellt.

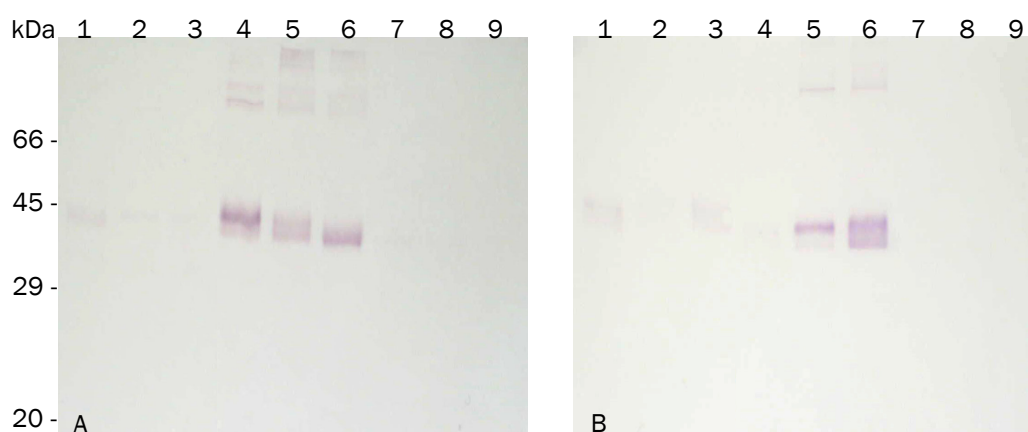


Abb. 4.39: Western Blot-Analyse der TGase-vermittelten Markierung von gereinigtem DAIP in Gegenwart von 0 – 3,4 mM N-Lauroylsarcosin mit biotinylierten Markern. Unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembranen nach Markierung der reaktiven Lysine von je 2,6 µg DAIP mit 67 µM ZQGB (A) und der reaktiven Glutamine mit 2 mM MBC (B) durch 25,8 mU TGase in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit verschiedenen LS-Konzentrationen für 2 h bei 37 °C. Spur 1 – 3: TGase mit 0 mM; 1,7 mM und 3,4 mM LS; Spur 4 – 6: DAIP + TGase mit 0 mM; 1,7 mM und 3,4 mM LS; Spur 7 – 9: DAIP mit 0 mM; 1,7 mM und 3,4 mM LS.

Es ist erkennbar, dass weder bei Verwendung von ZQGB (A) noch MBC (B) eine Markierung der DAIP-Kontrollen ohne TGase (Spur 7 – 9) vorhanden war. Die TGase-Kontrollen ohne DAIP (Spur 1 – 3) wiesen nur eine sehr schwache Markierung auf, sodass zweifelsfrei davon ausgegangen werden konnte, dass DAIP durch TGase (Spur 4 – 6) biotinyliert wurde. Durch ZQGB konnte in keinem Ansatz die Vernetzung von DAIP verhindert werden, die Markierung der Oligomere weist jedoch auch hier auf einen Abbruch der Vernetzung durch den kompetitiven ZQGB-Einbau hin. Eine leichte Tendenz ist erkennbar, dass die Markierung der Lysine von DAIP in Gegenwart von LS abnimmt. LS reduziert offensichtlich die Reaktivität der Lysinreste von DAIP, indem es diese wahrscheinlich durch seine negative Ladung über Bildung von Salzbrücken maskiert. Dies führte zu der Überlegung, dass eine positiv geladene Acylamidoverbindung für die DAIP-Vernetzung günstiger sein sollte. Das käufliche Detergenz N-(3-Dimethylamino)propyllauramid (LPA) besitzt bei neutralem pH eine positive Ladung und wurde in weiteren Versuche unter gleichen Bedingungen eingesetzt. In Abb. 4.40 sind die Ergebnisse der TGase-katalysierten Reaktion mit ZQGB (A) und MBC (B) unter Verwendung von 0 – 3,5 mM LPA dargestellt.

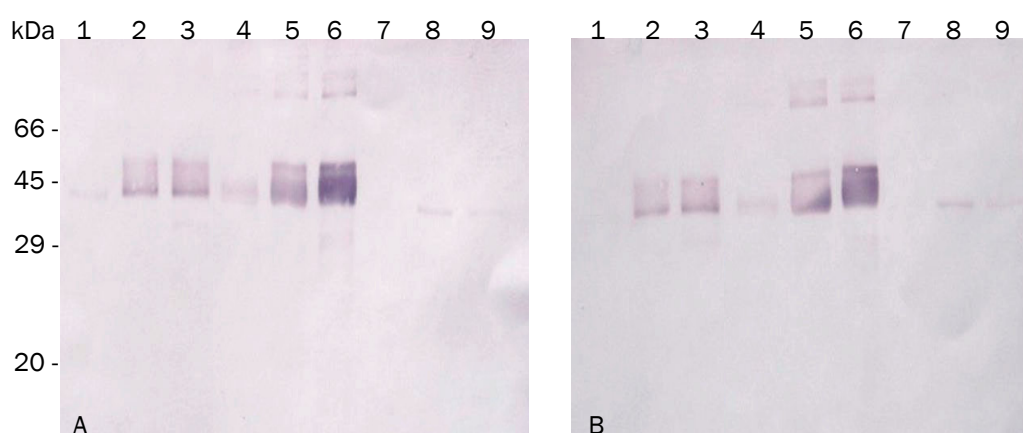


Abb. 4.40: Western Blot-Analyse der TGase-vermittelten Markierung von DAIP in Gegenwart von N-(3-Dimethylamino)propyllauramid (LPA) mit biotinylierten Markern. Unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembranen nach Markierung der reaktiven Lysine von je 2,6 µg DAIP mit 67 µM ZQGB (A) und der reaktiven Glutamine mit 2 mM MBC (B) durch 25,8 mM TGase in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit verschiedenen LPA-Konzentrationen für 2 h bei 37 °C. Spur 1 – 3: TGase mit 0 mM; 1,8 mM und 3,5 mM LPA; Spur 4 – 6: DAIP + TGase mit 0 mM; 1,8 mM und 3,5 mM LPA; Spur 7 – 9: DAIP mit 0 mM; 1,8 mM und 3,5 mM LPA.

Die Biotinylierung von DAIP mit ZQGB und MBC in Gegenwart von LPA zeigte ähnliche Ergebnisse. Die TGase-Kontrollen (Spur 1 – 3) wiesen bei 1,8 und 3,5 mM LPA eine Markierung auf, wobei es keinen Unterschied in der Intensität gab. In Abwesenheit des Acylpolyamins markierte sich die TGase praktisch nicht. Der Einbau beider biotinylierter Marker in DAIP wurde durch LPA mit steigender Konzentration erheblich verbessert.

Vergleiche mit der Bandenintensität der TGase-Kontrollen weisen darauf hin, dass es sich hier um biotinylierten DAIP handeln musste. Auch in diesem Fall konnte die Bildung von markierten Oligomeren nicht unterdrückt werden. Eine Veränderung der Laufeigenschaft von DAIP, hervorgerufen durch LPA, ist bei Betrachtung der DAIP-Kontrollen (Spur 7 – 9) auszuschließen, bei denen es in Gegenwart von LPA zu einer leichten unspezifischen Anlagerung der Marker kam. Vielmehr scheint sich die Laufeigenschaft von DAIP durch den zunehmenden Grad der Markierung zu verändern, was gleichzeitig eine Erklärung für die etwas gestreckte Bande des markierten DAIP im Biotin-Streptavidin-Blot wäre. In Abb. 4.41 ist nochmals der Effekt von LPA auf die Lysine (A, B) und Glutamine (C, D) von DAIP verdeutlicht.

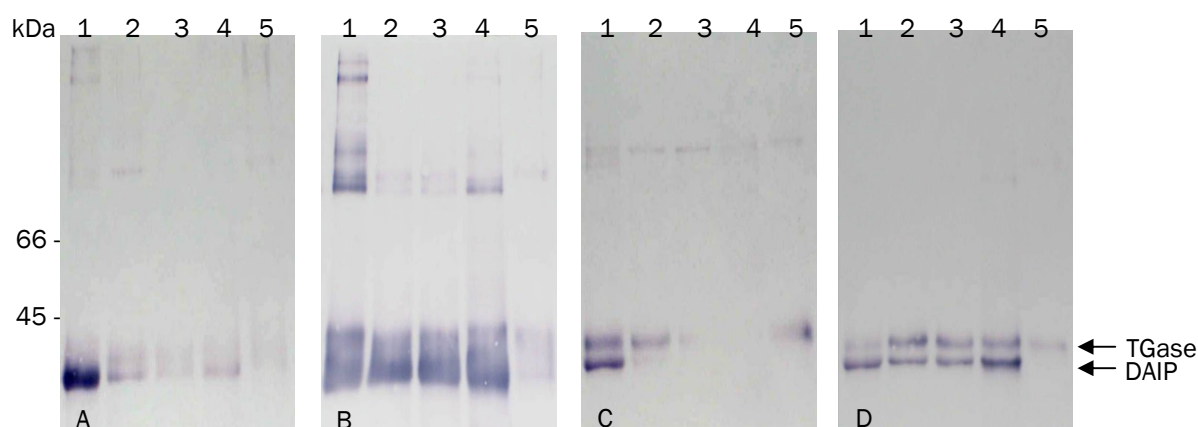


Abb. 4.41: Western Blot-Analyse von gereinigtem DAIP aus unterschiedlich alten Kulturüberständen von *S. mobaraensis* nach TGase-vermittelter Markierung in Abwesenheit und Gegenwart von N-(3-Dimethylamino)propylauramid (LPA) mit biotinylierten Markern. Unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugates angefärbte Nitrocellulosemembranen nach Markierung der Lysine von je 3,6 µg DAIP mit 125 µM ZQGB (A, B) und der Glutamine mit 2 mM MBC (C, D) in 0,1 M HEPES pH 7,5 durch 27,5 mU TGase ohne LPA (A, C) und in Gegenwart von 1,8 mM LPA (B, D) für 2 h bei 37 °C. Spur 1: DAIP 48 h; Spur 2: DAIP 66 h; Spur 3: DAIP 73 h; Spur 4: DAIP 93 h; Spur 5: TGase.

In Abb. 4.41B und D ist deutlich zu erkennen, dass durch Zugabe von 1,8 mM des Substratmodulators zum Biotinylierungsansatz DAIP sehr intensiv markiert wurden. Besonders ist dies bei den 66 – 93 h alten Proben (Spuren 2 – 4) verglichen mit den Ansätzen ohne LPA (Abb. 4.41A und C, Spuren 2 – 4) sichtbar. In Gegenwart von ZQGB wurde die „unmodifizierte“ 48 h alte Probe bei Zugabe von 1,8 mM LPA zusätzlich stärker durch mehr exponierte reaktive Seitenketten polymerisiert (B, Spur 1), was vermutlich auch auf die niedrige Konzentration des kompetitiv inhibierende Peptids zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass während der Kultivierung die Glutamine, wie bei SSTI, hydrolysiert und Glutamate gebildet werden. LPA führt zum Freilegen kryptischer Glutamine und somit ist eine Markierung wieder möglich. Lysine verschwinden nicht durch intramolekulare Isopeptidbindungen, sondern bilden wahrscheinlich mit den durch

Hydrolyse entstandenen Glutamaten Salzbrücken, durch LPA werden sie aus diesen gedrängt, da es keine Peptidbindungen hydrolysieren kann.

Bei einer zeitabhängigen Vernetzung von DAIP bei pH 7,5 in Anwesenheit von 1,8 mM LPA für bis zu 18 h bei 37 °C konnten mit spezifischen DAIP-Antikörpern Di- und Trimere nachgewiesen werden (Abb. 4.42).

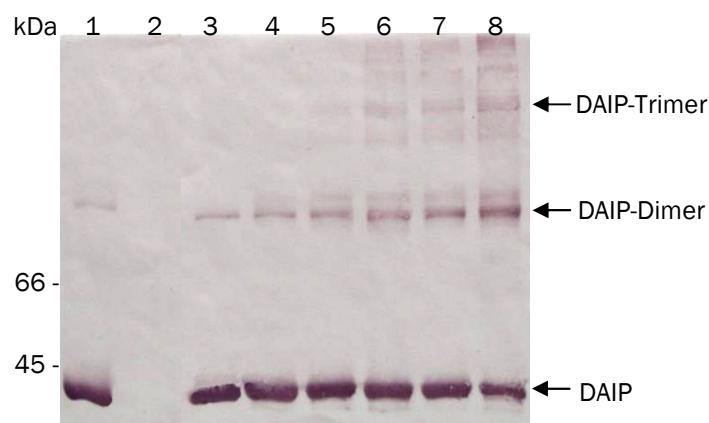


Abb. 4.42: Vernetzung von DAIP durch TGase in Gegenwart von 1,8 mM N-(3-Dimethylamino)propylauramid. Für die Vernetzung wurde TGase (0,249 mg/ml) in einem molaren Verhältnis von 1:4 mit DAIP (0,344 mg/ml) in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 1,8 mM LPA für bis zu 18 h bei 37 °C inkubiert. Immunchemisch, nach Inkubation mit DAIP-spezifischen Antikörpern, gefärbte Nitrocellulosemembran nach Transfer der Proteine. Spur 1: DAIP; Spur 2: TGase; Spur 3 – 8: DAIP + TGase nach 0 h; 1 h; 2 h; 3 h; 4 h und 18 h.

Da gereinigter DAIP (Spur 1) bereits etwas Dimer enthielt, war dieses auch direkt nach dem Mischen der ersten Polymerisationsprobe erkennbar und wurde nachfolgend durch TGase verstärkt. Bereits nach drei Stunden sind höhermolekulare Aggregate erkennbar. Auch nach 18 h Inkubation mit 1,8 mM LPA wurde jedoch keine vollständige Polymerisation erreicht.

Untersuchungen zum Einfluss von LS und LPA auf DAIP zeigten, dass die Acylaminosäure bis 3,4 mM keinen Einfluss auf die Aktivität des Inhibitors hatte, das Acylpolyamin senkte jedoch ab 2,1 – 2,5 mM signifikant die Aktivität von DAIP bis auf 37% Restaktivität bei 3,5 mM. Der Einsatz von 1,8 mM in Markierungs- und Vernetzungsversuch war jedoch unbedenklich, da er offensichtlich nicht zu Konformationsänderungen führte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Markierung von DAIP in Gegenwart der verwendeten Acylverbindungen unterschiedliche Ergebnisse erbrachte. Steigende Konzentrationen an N-Lauroylsarcosin erhöhten in der TGase-Reaktion die Reaktivität der

Glutaminreste, während die Markierung der Lysinreste von DAIP offensichtlich behindert wurde. N-(3-Dimethylamino)propyllauramid dagegen steigerte sowohl die Reaktivität der Lysin- als auch der Glutaminreste von DAIP. Die Ursache für das Verhalten beider Wirkstoffe dürfte in der unterschiedlichen Ladung zu suchen sein. Die Ergebnisse belegen zusätzlich, dass die bei DAIP beobachtete Abnahme markierbarer Lysin- und Glutaminreste während der Kultivierung nicht auf die Bildung intramolekularer Peptidbindungen zurückzuführen ist. Intramolekulare Isopeptidbindungen können durch LPA nicht hydrolysiert werden. Hingegen kann das Acylpolyamin Lysinreste aus Salzbrücken verdrängen.

4.8.3 Einfluss der Modulatoren auf Fremdproteine

Mit N-Lauroylsarcosin und N-(3-Dimethylamino)propyllauramid wurden erstmals Wirkstoffe entdeckt, die das Proteinsubstrat und nicht das Vernetzungsenzym TGase aktivieren. Diese Erkenntnis ist sowohl wissenschaftlich als auch wirtschaftlich von Bedeutung. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden beispielhaft mit zwei industriellen Proteinen durchgeführt, die nicht von *S. mobaraensis* stammen und deren Substrateigenschaften in Gegenwart der neuen Substratmodulatoren charakterisiert wurden. Bei dem einen Protein handelte es sich um das Molkeproteinisolat Protarmor, das 75% β -Lactoglobulin (18,3 kDa) enthält. Das andere war ein pflanzliches Lectin. Die Proteine wurden von N-Zyme BioTec und Zedira, Darmstadt, zur Verfügung gestellt. Von beiden war bekannt, dass sie keine Substrate von bakterieller TGase sind. Protarmor wird im Lebensmittelbereich eingesetzt, und eine enzymatische Vernetzbarkeit brächte technische Vorteile. Das Lectin findet seinen Einsatz im medizinisch-diagnostischen Bereich. Das primäre Ziel war eine enzymatische Fluoreszenzmarkierung.

Zur Bestimmung des geeigneten Substratmodulators wurden zuerst Standardbiotinylierungsversuche bei pH 7,5 in Gegenwart von 2,4 mM LS bzw. 2,5 mM LPA für 2 h bei 37°C durchgeführt. Als Kontrollen dienten die jeweiligen Ansätze ohne Substratmodulator. Es zeigte sich, dass Protarmor bereits ohne Substratmodulator mit ZQGB markierbar war. LS schwächte den enzymatischen Einbau ab, wahrscheinlich wieder wie bei DAIP durch Maskierung von Lysinen über Salzbrücken. Beim Lectin waren in den Ansätzen mit und ohne LS die Kontrollen ohne TGase ebenfalls markiert, daher wurde hier von einer unspezifischen Anlagerung des ZQGB an das Protein ausgegangen und es konnte in diesem Fall keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob das Protein

ein Lysinsubstrat ist. Bei Protarmor handelt es sich auch ohne LS um ein relativ starkes Glutaminsubstrat. Durch die Zugabe von LS konnte eine leichte Verstärkung der Markierung erzielt werden. Beim Lectin war eine massive Verstärkung der Markierungsreaktion zu beobachten, was darauf hindeutet, dass durch den Modulator im Ansatz die Glutaminreste der Proteine besser für TGase zugänglich gemacht wurden. Mit LPA im Ansatz konnte eine deutliche Steigerung der Markierung der Lysine beider Proteine gezeigt werden, obwohl immer noch eine unspezifische Anlagerung des biotinylierten Dipeptids an das Lectin stattfand, was wahrscheinlich auf dessen starke Hydrophobizität zurückzuführen ist. Die Glutaminseite wurde beim Lectin etwas schwächer markiert, als mit LS im Ansatz, aber immer noch deutlich besser als ohne Modulator.

Mit Protarmor wurden anschließend Vernetzungsversuche bei pH 7,5 und 37 °C in Gegenwart von 2,4 mM LS bzw. 2,5 mM LPA durchgeführt (Abb. 4.43). Die Reaktionszeit betrug 24 h.

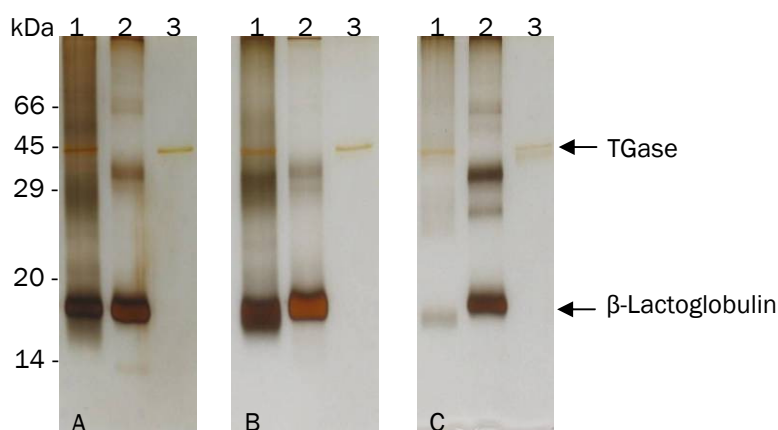


Abb. 4.43: Vernetzung von Protarmor durch TGase in Gegenwart von 2,4 mM N-Lauroylsarcosin oder 2,5 mM N-(3-Dimethylamino)propylauramid. Je 6,2 µg Protarmor wurden mit 27,5 mU TGase in 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 2,4 mM LS oder 2,5 mM LPA für 2 h bei 37 °C inkubiert. Silbergefärbte Polyacrylamid-Gele. (A) ohne Modulator, (B) mit 2,4 mM LS, (C) mit 2,5 mM LPA. Spur 1: Protarmor + TGase; Spur 2: Protarmor; Spur 3: TGase.

Ohne Zugabe eines Modulators wurde mit TGase offensichtlich nur ein geringer Teil von Protarmor vernetzt, was an der leichten Abnahme der Bande bei ca. 18 kDa (β-Lactoglobulin; A, Spur 1) und dem, gegenüber der Kontrolle ohne Enzym, verstärkt auftretenden Proteinkontinuum zu erkennen ist. Der Ansatz mit 2,4 mM LS zeigte ein ähnliches Ergebnis (B, Spur 1). Bei Zugabe von 2,5 mM LPA konnte bereits nach 2 h eine starke Polymerisierung beobachtet werden (nicht dargestellt), nach 24 h war Protarmor fast vollständig vernetzt (C, Spur 1). Da kaum ein Polymer am Einlauf zum Trenngel

sichtbar war, sollte mit GPC-Analysen eindeutig bestätigt werden, dass TGase Protarmor in Gegenwart von 2,5 mM LPA vernetzt. Bei diesen Untersuchungen kam es zur Abnahme des Protarmor-Gipfels nach 2 und 24 h Inkubation mit TGase. Weiterhin wurde ein weißer Niederschlag beobachtet, der nach Zentrifugation nur mit LS-haltigen Puffer in Lösung gebracht werden konnte. Die Auftrennung des gelösten Niederschlags ergab einen Gipfel an der Ausschlussgrenze der Säule, was auf ein hochpolymeres Protein hinweist (Ergebnisse nicht dargestellt).

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Hypothese über den Wirkmechanismus der beiden Substratmodulatoren um ein allgemeingültiges Prinzip handelt, wurden weitere Proteine mit ZQGB und MBC unter den bereits für Protarmor beschriebenen Bedingungen biotinyliert. Die semiquantitativen Ergebnisse der Biotinylierungsreaktion sind in Tab. 4.3: zusammengefasst.

Tab. 4.3: Zusammenstellung einiger Proteine bei denen durch Substratmodulatoren eine Beeinflussung der Markierung von Lysin- und Glutaminresten erreicht werden konnte. Erläuterungen: - = keine Markierung; + = schwache Markierung; ++ bis +++ = gute bis sehr gute Markierung.

Protein	Markierung ohne Modulator		Markierung in Gegenwart von LPA		Markierung in Gegenwart von LS	
	Lysine	Glutamine	Lysine	Glutamine	Lysine	Glutamine
Carboxypeptidase A	+	+	++	+	++	+++
Carboxypeptidase B	+	-	+++	-	+	+
γ -Crystallin	-	-	+	+	-	+
Lactat-Dehydrogenase	++	++	+++	+++	+	+++
Lectin (pflanzlich)	-	+	-	++	-	+++
Lysozym	+	+	++	+	++	++
Ovalbumin	-	-	++	+	+	+
Ovotransferrin	+	+	++	+	+	+
Meerrettich-Peroxidase	++	++	+++	++	++	+++
alkalische Phosphatase	+	-	+	+	+	+
Citrat-Synthase	-	-	++	+	+	+

Es konnte anhand dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass einige der gewählten Proteine bereits ohne Modulator Substrate der bakteriellen TGase sind. N-Lauroylsarcosin hatte hauptsächlich einen Einfluss auf die Glutaminreste der verwendeten Proteine, indem die Markierung mit MBC ermöglicht oder verstärkt wurde. Die Lysinreste wurden überwiegend nicht beeinflusst. Bei Carboxypeptidase A, Citrat-Synthase, Lysozym und Ovalbumin wurde die Markierung mit ZQGB ebenfalls leicht verstärkt. N-(3-Dimethylamino)propyllauramid konnte sowohl eine Verstärkung der Markierung von Glutaminen als auch Lysinen begünstigen, wobei der Einfluss auf Lysine deutlich ausgeprägter war. Bei einigen Proteinen konnte in zusätzlichen Vernetzungsreaktionen

die Wirkung der Modulatoren bestätigt werden (nicht dargestellt), wobei genauere Untersuchungen nötig wären. Bei Aldolase und Malat-Dehydrogenase, die beide keine Substrate der bakteriellen TGase sind, konnte auch nach Zugabe der Modulatoren keine Markierung erzielt werden (nicht dargestellt).

Abschließend wurden Untersuchungen zur Fluoreszenzmarkierung des pflanzlichen Lectins mit 2 mM MDC durchgeführt. Nach ersten Versuchen in 0,1 M HEPES pH 7,5 stellte sich LS mit 1,7 mM als der am besten geeignete Modulator heraus. Zur Bestimmung der optimalen Markierungsbedingungen wurden weiterhin der pH zwischen 5,0 – 9,0 mit 0,1 M Tris-Acetat, die Proteinmenge zwischen 2 – 10 µg und TGase zwischen 11 – 110 mU variiert. Als ideal stellten sich unter den getesteten Bedingungen für die Markierung des Lectins mit MDC neben 1,7 mM LS ein pH von 9,0 sowie 27,5 mU TGase bei 10 µg Protein heraus. Dabei wurde beobachtet, dass auch ohne Zusatz von LS bei pH 9,0 bereits eine Markierung möglich war, die durch den Modulator verstärkt wurde (nicht dargestellt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass LS bei allen getesteten Proteinen bevorzugt Glutaminreste für die TGase-Reaktion aktivierte, LPA hingegen verstärkte die Reaktivität der Lysinreste der Proteine.

5. Diskussion

Auch knapp 20 Jahre nach der Entdeckung von bakterieller Transglutaminase (TGase) bei einem Stamm von *Streptomyces mobaraensis* (Ando *et al.* 1989) ist wenig über die physiologische Funktion des Enzyms bekannt. Es wird aber angenommen, dass es wegen seiner hohen Exportrate eine besondere Rolle in dem sehr komplexen Lebenszyklus von Mitgliedern der ehemaligen Gattung *Streptoverticillium* spielen könnte, den diese mit allen Streptomyceten gemeinsam haben, und worauf noch etwas genauer eingegangen werden wird. In dieser Arbeit wurden mit dem Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor SSTI und dem Dispase-Autolyse induzierenden Protein DAIP zwei Substratproteine von TGase identifiziert und näher charakterisiert. Damit wurde eine erste Grundlage für die Aufklärung der Funktion des Enzyms von *S. mobaraensis* geschaffen. Für ein besseres Verständnis von TGase, ihrer Substrate und deren möglicher Funktionen soll zunächst kurz auf die einzelnen Komponenten eingegangen werden.

Die in der Natur ubiquitär vorkommenden Transglutaminasen (TGase; Protein-Glutamin: Amin γ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) sind Enzyme, die Proteine durch Bildung inter- oder intramolekularer ϵ -(γ -Glutamyl)lysin-Isopeptidbindungen polymerisieren. Sie wurden in verschiedenen Organismen, darunter Wirbeltiere, Wirbellose, Pflanzen, Pilze und Bakterien, identifiziert. Nach dem heutigen Kenntnisstand spielen diese Enzyme eine wichtige Rolle in den verschiedensten biologischen Prozessen, die vorteilhaft für die Produzenten sind. Wirbeltiere besitzen meist mehrere Isoformen in unterschiedlichen Geweben, die sich in ihrer Spezifität gegenüber den Substratproteinen unterscheiden und deren Funktionen weitgehend bekannt sind, z. B. ist die Keratinocyten-TGase für die Bildung von keratinisierten Mänteln um die Korneozyten im Stratum corneum (Hornschicht der Haut) verantwortlich, wodurch eine schwer penetrierbare Barriere gegen die Umwelt entsteht. In Pflanzen spielen sie wahrscheinlich eine ähnliche Rolle wie bei Tieren, aber es werden aufgrund ihres Auftretens in spezifischen Kompartimenten und den verschiedenartigen Substraten zusätzliche Funktionen angenommen (Chen & Mehta 1999, Griffin *et al.* 2002, Lorand & Graham 2003, Del Duca & Serafini-Fracassini 2005, Rao *et al.* 2005, Metha & Eckert 2005). Ein charakteristisches Merkmal der eukaryotischen Enzyme ist die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von Ca^{2+} . Dagegen benötigt TGase von *Streptomyces mobaraensis* keinen Cofaktor. Sie besitzt außerdem keine Sequenzhomologie mit anderen bekannten Ca^{2+} -abhängigen oder -unabhängigen

TGasen (Makarova *et al.* 1999), nur zu den bereits in der Einleitung aufgeführten Enzymen von Streptomyceten, wobei die meisten Produzenten der ehemaligen Gattung *Streptoverticillium* zuzuordnen sind. *S. mobaraensis* gehört zur Gattung *Streptoverticillium*, die 1990 durch Witt und Stackebrandt aufgrund von 16S rRNA-Analysen wieder in die Gattung *Streptomyces* eingegliedert wurde, obwohl sie sich morphologisch und biochemisch in einer Reihe von Merkmalen unterscheiden.

SSTI wurde als erstes Substratprotein von TGase entdeckt. Es handelt sich um einen bereits seit längerem bekannten Vertreter der großen Protein-Familie der *Streptomyces* Subtilisin Inhibitoren SSI (Zotzel 2002), zu der auch die „SSI-like proteins“ (SIL) gehören. Der erste proteinogene Inhibitor dieser Art wurde bei *Streptomyces albogriseolus* S-3253 entdeckt (Murao *et al.* 1972, Obata *et al.* 1989). Es handelt sich um Dimere mit zwei identischen Untereinheiten, die hauptsächlich Serinproteasen hemmen und bei vielen *Streptomyces*- und verwandten Arten vorkommen (Taguchi *et al.* 1994, 1997, Taguchi 1995a). Bei einigen Proteinen dieser Familie handelt es sich, wie auch bei SSTI, um doppelköpfige Inhibitoren. Die Bezeichnung doppelköpfig stammt von der Fähigkeit, Serinproteasen wie Subtilisin A von *B. licheniformis* und Trypsin von *Bos taurus* und Metalloproteasen wie die TGase aktivierende TAMEP an zwei verschiedenen Stellen zu binden (Hiraga *et al.* 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass die SIL-Proteine von ehemaligen *Streptoverticillium* Arten phylogenetisch zu den SIL-Proteine der anderen *Streptomyces* Arten gehören, aber eine monophyletische Gruppe bilden. So identifizierten Taguchi *et al.* 1997 die Aminosäuren Gln⁵², Lys⁶⁷, Pro¹⁰⁰ und Lys¹⁰⁷ als konservierte Reste der SIL-Proteine von Streptoverticillien, nicht aber der von Streptomyceten. Auch das spricht weiter dafür, dass die phylogenetische Eingliederung der Streptoverticillien in die Gattung *Streptomyces* überarbeitet werden sollte (Taguchi *et al.* 1997). Die weite Verbreitung dieser Proteine bei den Actinobakterien weist auf eine wichtige Rolle hin. Aber, wie bakterielle TGase, ist SSI biochemisch gut charakterisiert, die physiologische Funktion für den produzierenden Organismus jedoch kaum bekannt. Es wird aber angenommen, dass die Hauptrolle eher in der Regulation der Aktivität intrinsischer als in der Abwehr extrinsischer Proteasen liegt. Neben TAMEP von *S. mobaraensis* wird auch die Chymotrypsin-ähnliche Serinprotease SAM-P20 von *S. albogriseolus* von einem SSI *in vitro* und *in vivo* inhibiert (Taguchi *et al.* 1995b, c).

DAIP ist ein neu entdecktes Protein, welches Dispase von *B. polymyxa* inaktiviert. Der Sequenzvergleich zeigt keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen. Und auch der

Wirkmechanismus dieses Proteins scheint neu zu sein. Es inhibiert neutrale Metalloproteasen nicht durch Blockade des Aktivzentrums oder als Komplexbildner durch Entzug der essentiellen zweiwertigen Metallionen. Vielmehr scheint DAIP die Autolyse des Enzyms zu induzieren (Sarafeddinov *et al.* 2008). Da TAMEP nicht inhibiert wird, gibt DAIP den ersten Hinweis, dass proteinogene Proteaseinhibitoren im Abwehrmechanismus des Organismus eine Rolle spielen könnten.

Mit dem *Streptomyces* Papain Inhibitor SPI wurde ein weiterer Proteaseinhibitor entdeckt, der gegen Cysteinproteasen gerichtet ist, nicht aber die mit Cysteinproteasen verwandte TGase hemmt (Sarafeddinov und Fuchsbauer, persönliche Mitteilung). Dieses Protein konnte in dieser Arbeit nicht mehr genauer charakterisiert werden, dürfte aber, wie orientierende Versuche gezeigt haben, ebenfalls ein Substrat von TGase sein.

Ein überraschendes Ergebnis dieser Arbeit war die Identifizierung der ersten Substratmodulatoren von bakterieller Transglutaminase. Die Lipoaminosäure N-Lauroylsarcosin (LS) und das Lipopolyamin N-(3-Dimethylamino)propyllauramid (LPA) exponieren offensichtlich kryptische Glutamine oder in Salzbrücken eingewobene Lysine und verbessern dadurch die Vernetzbarkeit der Substratproteine. Die möglichen Wirkmechanismen beider Substanzen sind in Abb. 5.1 dargestellt.

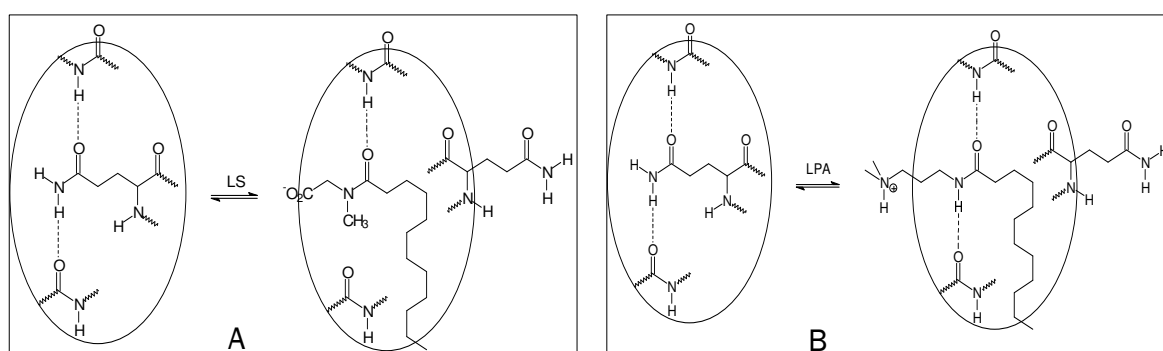


Abb. 5.1: Möglicher Mechanismus der Exposition proteingebundener Glutamine in die wässrige Umgebung durch N-Lauroylsarcosin (A) oder N-(3-Dimethylamino)propyllauramid (B).

Lipoaminosäuren besitzen strukturelle Ähnlichkeiten mit Glutaminen. Der Zugang der TGase zu proteingebundenen Glutaminen könnte möglicherweise eingeschränkt sein, wenn die Seitenketten nahe an hydrophoben Proteinregionen liegen, die die Spacer-Methylengruppen anziehen. Interaktionen des γ -Carboxamids mit anderen dipolaren Proteinfunktionen, wie z. B. Peptidbindungen, unterstützen und stabilisieren die Bindung. Lipoaminosäuren wie LS haben sowohl eine gesättigte Kohlenwasserstoffkette als auch

eine Carboxamidgruppe, die es dem Molekül ermöglichen, kryptische Glutamine kompetitiv zu verdrängen. So werden zusätzliche Glutamine in eine wässrige Umgebung exponiert und der TGase zugänglich gemacht. LPA hat wie LS eine Acylamidostruktur um γ -Carboxamidgruppen kryptischer Substratglutamine zu verdrängen. Die Methylierung der Aminofunktion verhindert einen TGase-vermittelten Einbau von LPA in die Substratproteine.

Bis jetzt konnten noch keine Lipoaminosäuren oder Lipopolyamine bei *Streptomyces mobaraensis* nachgewiesen werden. Erste Experimente zeigen jedoch, dass extrahierbare Detergenzien im Grammaßstab ($> 1 \text{ g/l}$) im Kulturüberstand vorkommen. 2007 beschrieben Koreishi *et al.* eine Penicillin V Acylase von *S. mobaraensis*, die neben β -Lactam-Antibiotika auch die Synthese von N-acylierte Aminosäuren katalysiert und somit ein Vorhandensein von Lipoaminosäuren bei diesem Bakterium sehr wahrscheinlich macht. Seit langem ist bekannt, dass die meisten Kulturen von Actinomyceten anstelle von Phospholipiden stickstoffhaltige Lipoaminosäuren produzieren, wenn Phosphat erschöpft ist. Dies zeigt eine Möglichkeit, die Zusammensetzung der mikrobiellen Membranlipide an die Bedingungen eines Habitats anzupassen (Kasymbekova & Konova 1979, Grafe *et al.* 1982). Phosphatmangel kann auch die Sporulation triggern (Daza *et al.* 1989) und möglicherweise durch die Bildung von Lipoaminosäuren die TGase-vermittelte Quervernetzung von Proteinen verbessern.

Welche Rolle könnten nun TGase, die Substrate SSTI, DAIP und SPI sowie Acylamide mit der Struktur von N-Lauroylsarcosin oder N-(3-Dimethylamino)propyllauramid im Lebenszyklus von *S. mobaraensis* spielen? Dazu soll kurz auf das natürliche Habitat der Mikroorganismen und den Lebenszyklus eingegangen werden.

Bei Streptomyceten handelt es sich um immobile, multizelluläre Bakterien, die meist den Boden, bevorzugt alkalisch oder neutral und mit guter Drainage, besiedeln. Es gibt allerdings mehrere Berichte, die zeigen, dass sie auch mit Pflanzen und Pilzhyphen assoziiert sind. Sie können diese kolonisieren, wie Befunde bei saprophytischen, pathogenen und Mycorrhiza-Pilzen oder Mycorrhizosphären von Pflanzen zeigen (Poole *et al.* 2001, Maier *et al.* 2004). Außerdem können sie, um nur einige Beispiele zu nennen, wurzelpathogene Pilze inhibieren und Pflanzenwachstum sowie Mycorrhizabildung fördern (Crawford *et al.* 1993, Yuan & Crawford 1995, Garbaye 1994, Frey-Klett *et al.* 2007). Sie nehmen entsprechend eine sehr wichtige Rolle als Vermittler von Symbiosen oder Pflanzenkrankheiten ein (Schrey & Tarkka 2008) und spielen eine regulatorische

Rolle in der mikrobiellen Population der Rhizosphäre (Staib *et al.* 1980). Durch diese wichtigen Funktionen sind Streptomyceten im Boden vielen Angriffen ausgesetzt, die möglicherweise nicht ausschließlich durch kleine antibiotische Verbindungen abgewehrt werden können. Ein weitergehender, umfassenderer Schutz dürfte notwendig sein. Die gefundenen Inhibitoren könnten die Funktion haben, dass sie zunächst in frühen Wachstumsphasen regulatorisch auf intrinsische Proteasen einwirken, wie bereits bei TAMEP gezeigt, dann aber auch Substrat- und Luftmycel sowie Sporen gegen extrinsische Proteasen schützen.

Der Lebenszyklus beginnt mit dem Auskeimen der Sporen, das als Antwort auf lösliche Nährstoffe stattfindet (Chater 2006). Anschließend kommt es in der ersten Wachstumsphase zur Ausbildung eines filamentösen, verzweigten Substratmycels, welches das Medium (abgestorbenes Blatt, Holz, totes Insekt etc.) besiedelt, indem es oberflächlich auf diesem und nach innen wächst (Kalakoutskii & Agre 1976, Hodgson 1992). Wenn alle löslichen Nährstoffe verbraucht sind, wird es Enzyme ausscheiden, die polymere Nährstoffe abbauen. Mit wachsender Biomasse reguliert jedes individuelle Hyphenkompartiment die Zusammensetzung und Menge der benötigten Enzyme strikt, um den effektiven Abbau des jeweiligen Substrates zu gewährleisten. Hier wäre ein mögliches Einsatzgebiet für die sekretierten Inhibitoren SSTI und SPI. Sie könnten intrinsische Enzyme regulieren, indem sie diese oder die sie aktivierenden Proteasen inhibieren, sodass nur die benötigte Nährstoffmenge abgebaut wird und diese gleichzeitig vor Konkurrenten geschützt ist. Ist dieser Mechanismus reversibel, kann ein Abbau des Inhibitors zur erneuten Hydrolyse polymerer Nährstoffe führen. In dieser Phase wird es aber vor allem darauf ankommen, kleine, hoch bewegliche Moleküle auszuschleiden, die die abgebauten Materialien vor andere Nahrungskonkurrenten schützen. Streptomyceten sind gerade dafür bekannt, dass sie zahlreiche peptidische Proteaseantagonisten wie beispielsweise Leupeptin, Antipain, Chymostatin etc. produzieren (Umezawa *et al.* 1970, Hanlon & Liener 1986, Kim *et al.* 1998). Dabei dürfte über die Abwehr potentieller Fressfeinde durch kleine wasserlösliche Antibiotika hinaus auch ein Schutzschild für die äußere Mureinschicht der Substrathyphen notwendig werden. Dieser könnte aus proteinogenen Bausteinen mit antibiotischen Eigenschaften konstruiert und durch Vernetzung mit TGase stabilisiert sein. Ein Hinweis darauf ist, dass *S. mobaraensis* im Vergleich zu *S. coelicolor*, ein wesentlich rigideres Substratmycel aufweist (Zotzel 2002). Dieses wiederum hat vermutlich den erheblichen Selektionsvorteil, dass ein längeres Überleben und somit die Reproduktion besser gewährleistet ist. Dass *S. coelicolor* A3(2)

sich genetisch von *S. mobaraensis* enorm unterscheidet, wurde bereits mehrfach betont. Das vollständig sequenzierte Genom des Modellorganismus besitzt weder ein Gen für TGase (Zotzel 2002) noch für DAIP und SPI.

Lufthyphen sind das reproduktive „Organ“, welches sich bei Oberflächenkulturen aufgrund von Nährstoffmangel nach ca. 35 h aus verbleibenden lebenden Segmenten des Substratmycel entwickelt (Manteca et al. 2005a, b, 2006, 2007) und mit der Bildung von Sporen sein Wachstum abschließt. Nimmt man die Erkenntnisse neuerer Arbeiten über einen Apoptose-ähnlichen Differenzierungsmechanismus (Nicieza et al. 1999, Manteca et al. 2005a, b, 2006, 2007) als Maßstab, dürfte es unwahrscheinlich sein, dass die in den lebenden Segmenten des Substratmycels angesammelten, Energie- und Bausteine liefernden Polymere durch intrinsische Hydrolyse noch einmal nach außen gelangen. Allerdings nutzt das Luftmycel sehr wahrscheinlich abgestorbene Segmente des Substratmycels, um Nährstoffe zu gewinnen (Wildermuth 1970), die mit Hilfe von Antibiotika möglicherweise vor Fraßfeinden zu schützen sind (Chater & Merrick 1979). Wie die Arbeiten von Claessen et al. (2003) und Elliot et al. (2003) gezeigt haben, ist das Luftmycel hydrophob. Anders als das Substratmycel verlässt es das wässrige Milieu und entsprechend muss das Bakterium Vorkehrungen treffen, dass es nicht zur Austrocknung, dem Verlust lebenswichtiger Moleküle oder Störung biochemischer Prozesse an der Plasmamembran und im Peptidoglycan kommen kann. Die Streptomyceten haben sich mit der Fähigkeit an der Luft zu sporulieren an eine Verbreitung durch Wind adaptiert. Sie ist aber möglicherweise auch eine Anpassung, Sporen besser für die Aufnahmen durch Arthropoden zugänglich zu machen, die die Mikroorganismen über die Oberfläche von Pflanzenresten aufnehmen und damit in ein anderes Habitat transportieren (Chater 2006). Das Luftmycel von *S. mobaraensis* und *S. coelicolor* unterscheidet sich vor allem phänotypisch. Bei Mitgliedern der ehemaligen Gattung *Streptoverticillium* wächst es anders als bei typischen Streptomycetenvertretern baumwollartig, was auf eine andere Oberflächenstruktur der Lufthyphen hinweist, an der wahrscheinlich auch andere Proteine als bei *S. coelicolor* beteiligt sind. Bei dieser Spezies sind nach neuesten Erkenntnissen im wesentlichen vier distinkte Gruppen von Proteinen als morphogenetische Faktoren für die Ausbildung der Lufthyphen notwendig, Rodline, Chapline, Sortasen und SapB (Elliot & Talbot 2004), welche bereits in der Einleitung näher charakterisiert wurden und an deren charakteristische Funktion hier nur noch kurz erinnert werden soll. Die Rodline RdlA und RdlB bilden das charakteristische Rodlet-Muster auf Lufthyphen und Sporen, die Gene werden nur während der

Lufthyphenbildung exprimiert und Mutanten können sich weniger gut an hydrophobe Oberflächen anheften (Elliot & Talbot 2004). Die Chapline decken die Oberfläche ab und machen sie hydrophob (Claessen *et al.* 2003, Elliot *et al.* 2003). Es wurden acht Chapline (ChpA – H) identifiziert, die alle eine hochkonservierte, ca. 40 Aminosäuren lange hydrophobe Domäne gemeinsam haben, die sogenannte „Chaplin-Domäne“. ChpD – H sind kurze Proteine mit nur einer Chaplin-Domäne, ChpA – C hingegen sind länger, besitzen zwei dieser Domänen und ein C-terminales „Sortier-Signal“, welches sie zum Zielmolekül für Sortasen macht. Sortasen sind Transpeptidasen, die spezielle C-terminale Motive aus fünf Aminosäuren erkennen, dort das C-terminale Ende aus meist 100 Aminosäuren abschneiden und den verbleibenden Rest mit der biologischen Funktion kovalent in das Peptidoglycan der Zellwand einbauen (Mazmanian *et al.* 1999). Lange Chapline werden somit kovalent in der Zellwand verankert, die kurzen möglicherweise nicht-kovalent durch Heteroassemblierung über die gemeinsame Chaplindomäne. Wahrscheinlich gibt es auch Interaktionen zwischen Rodlinen und Chaplinen (Elliot & Talbot 2004). SapB ist ein 21 AS großes, hydrophobes Peptid, welches, ähnlich wie Chapline, oberflächenaktive Eigenschaften besitzt, da es die Oberflächenspannung von Wasser an der Wasser-Luft-Grenzfläche von 72 auf 32 mJ/ m² senken kann (Tillotson *et al.* 1998). Diese Proteine wurden aber bis jetzt bei *S. mobaraensis* nicht identifiziert. Auch wenn wahrscheinlich noch nicht nach ähnlichen Proteinen bei dieser Art gesucht wurde, muss in diesem Zusammenhang erneut betont werden, dass phylogenetische Untersuchungen der SSI- und SIL-Proteine die Eingruppierung von *S. coelicolor* in eine eigene monophyletische Gruppe zur Folge hatte. Der Modellorganismus ist aus diesem Grund nicht direkt mit *S. mobaraensis* vergleichbar. So wäre ohne weiteres denkbar, dass bereits die drei gefundenen Substrate zusammen mit TGase und evtl. gebildeten Lipoaminosäuren oder Lipopolyaminen für die Bildung einer hydrophoben Oberfläche der Lufthyphen und Sporen sorgen. Die beiden letzteren Substanzen, aber auch SSTI könnten als natürliche oberflächenaktive Substanzen wirken und ein Wachsen der Hyphen in die Luft durch Senkung der Oberflächenspannung von Wasser unterstützen. Bei *S. hygroscopicus* wurde von Zhang *et al.* (2008) der TGase aktivierenden Protease Inhibitor (TAPI), welcher zu den SSI gehört, mit oberflächenaktiven Eigenschaften beschrieben. Da SSTI die ersten beiden Eigenschaften mit TAPI gemeinsam hat, ist es somit durchaus denkbar, dass er ebenfalls oberflächenaktiv wirkt. Das würde für eine Beteiligung an der Bildung der Lufthyphenoberfläche sprechen, wie dies mit den Chaplinen und SapB gezeigt wurde. Lipoaminosäuren oder Lipopolyamine könnten gleichzeitig durch Verbesserung der Substrateigenschaften die Zugänglichkeit und Vernetzung von SSTI

und DAIP, möglicherweise auch von SPI, fördern und zur Abdichtung in die Oberfläche der Lufthyphen beitragen. Ihre inhibitorischen Eigenschaften sorgen entsprechend für die Abwehr möglicher Feinde, indem sie deren Proteasen blockieren oder zerstören. Auch die Thermostabilität von SSTI und SPI deuten auf eine äußere Anordnung der Proteine hin, mit der sich der Organismus gegen Schäden durch Hitze schützen könnte. Sollten die antibiotischen TGase-Substrate ihre wesentliche Funktion an der Oberfläche von Lufthyphen und Sporen ausüben, erscheint die Fähigkeit zur Selbstassemblierung, wie bei Chaplinen beschrieben, als wahrscheinlich. Kommt es in diesem Fall zur einer Fehlanordnung, beispielsweise, indem Glutamin- und Lysinreste nicht in räumlicher Nähe zueinander zum Liegen kommen, könnte TGase die Glutaminseitenketten falsch angeordneter Bausteine hydrolysieren und damit die irreversible Bildung einer lückenhaften Struktur verhindern. Die enzymatische Glutaminhydrolyse geht, wie in dieser Arbeit gezeigt, erstaunlich schnell vonstatten. Regulation von Proteasen oder antibiotische Abwehr blieben davon unberührt, da modifizierter SSTI immer noch in der Lage ist als Inhibitor zu fungieren. Lipoaminosäuren oder Lipopolyamine können die antibiotische Wirkung verstärken, wenn sie während der Lufthyphenbildung ausgeschieden werden. So wurde aus den Hemocyten der Spinne *Acanthocurria gomesiana* ein Acylpolyamin mit antibiotischen Eigenschaften isoliert (Pereira *et al.* 2007). Möglicherweise werden sie in gewissem Maß zusätzlich in die Oberfläche der Lufthyphen integriert. TGase könnte z. B. die Funktion der membranverankerten Sortase übernehmen, welche die großen Chapline in der Zellwand von *S. coelicolor* verankert, indem sie ihrerseits sich selbst in der Membran und die Substrate im Peptidoglycan verankert. Allerdings wurde von Zotzel 2002 in seiner Dissertation bereits die Möglichkeit der Verankerung von TGase durch Signalpeptidasen in der Zellwand diskutiert, weil das Signalpeptid eine potentielle Spaltstelle für die Signalpeptidase II trägt, die sekretorische Proteine mit geeigneten Glycerinphospholipide in der Cytoplasmamembran über eine stabile Thioetherbindung verknüpft. TGase wird nur unter den artifiziellen Bedingungen der Flüssigkultur in großen Mengen ins Medium ausgeschieden. Plattenkulturen scheiden keine nachweisbaren Mengen des unter submersen Bedingungen sehr löslichen Enzyms aus. Vermutlich wird die Verankerung von TGase mechanisch durch Schütteln oder Rühren verhindert. Unter solchen Bedingungen können wahrscheinlich auch die Substrate nur schlecht assemblieren, was, wie seit langem bekannt, auch zur unvollständigen Ausbildung von Lufthyphen führt. Hinweise für eine Beteiligung der TGase an der Bildung der Lufthyphen sind zum einen das in dieser Arbeit gezeigte Fehlen des Luftmycel bei Inhibition des Enzyms durch Cadaverin im GYM-Medium. Des Weiteren

wurden hier erste Hinweise auf das Vorhandensein von SSTI, DAIP, TGase und ihrer aktivierenden Protease TAMEP in der Zellwand durch den Nachweis mit spezifischen Antikörpern im isolierten Zellwandpolymer erbracht.

Reifende und reife Sporen von ehemaligen Streptovorticillien besitzen eine charakteristische Sporenhüllstruktur (Attwell et al. 1973) und die Mikroorganismen selbst häufig eine Resistenz gegenüber Lysozym (Kutzner et al. 1978) und Neomycin (Goodfellow & Cross 1984). Diese ist bei *Streptomyces*-Arten nicht zu finden und hängt vermutlich mit einer andersartigen Zellwandstruktur zusammen. Mit Hilfe von TGase und den hier erstmals identifizierten Substratproteinen könnte bei ehemaligen Streptovorticillien eine spezielle Oberfläche geschaffen werden, die wiederum für die geringe Durchlässigkeit bestimmter Antibiotika verantwortlich ist. Diese Eigenschaft erscheint hinsichtlich des natürlichen Habitats der Bakterien und ihre Rolle, die sie in diesem spielen, bedeutsam. Es wäre auch möglich, dass die TGase-Substrate und Lipoaminosäuren oder Lipopolyamine neben den Lufthyphen auf den Sporen vorkommen könnten. So wurde SapB ursprünglich von der Sporenoberfläche von *S. coelicolor* isoliert (Guijarro et al. 1988).

Interessanterweise sind SSTI und DAIP Antagonisten für Proteasen (Subtilisin und Dispase) der Gattung *Bacillus*. SPI inhibiert Cysteinproteasen, die allerdings bei *Bacillaceae* noch nicht identifiziert wurden. Erwähnenswert erscheint jedoch in diesem Zusammenhang, dass es sich z. B. bei der Sortase von *B. anthracis* um ein Cysteinprotein handelt, welches in der Zellwand verankert und wichtig für die Sporenbildung ist (Marraffini & Schneewind 2006). Somit könnte das potentielle Abwehrprotein SPI durch Hemmung von Sortasen die Vermehrung von *Bacillus*-Arten verhindern. Dass die identifizierten TGase-Substrate vorzugsweise gegen *Bacillus*-Enzyme gerichtet sind, mag mit deren Verbreitung im natürlichen Habitat von *S. mobaraensis* zusammenhängen. Bacilli sind hoch bewegliche Bakterien, die den immobilen Streptomyceten die löslichen Nährstoffe entziehen oder aber, wie von Straight et al. 2006 mit *B. subtilis* gezeigt, ihre Vermehrung durch Behinderung von Lufthyphen- und Sporenbildung einschränken. Oberflächenaktives Surfactin von *Bacillus* greift dabei erfolgreich in die Ausbildung der hydrophoben Proteinoberfläche von *S. coelicolor* ein und stört den weiteren Entwicklungsprozess.

Weiterhin ist vorstellbar, dass SSTI in der frühen Wachstumsphase von *S. mobaraensis* die Vernetzungsaktivität der TGase kontrolliert, indem die Prozessierung des Enzyms durch Inhibition der TAMEP verhindert wird. In Abb. 5.2 ist der mögliche Mechanismus dargestellt, über den SSTI die TGase regulieren kann.

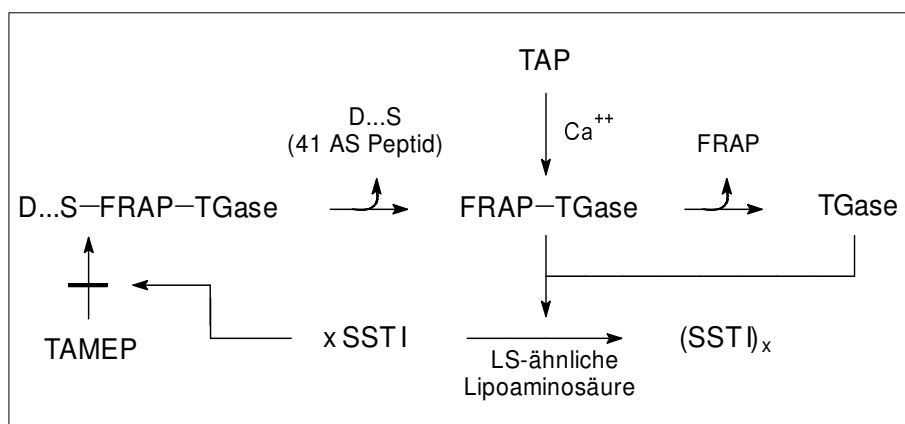


Abb. 5.2: Prozessierung und Regulation der TGase von *S. mobaraensis*. Die Metalloprotease TAMEP aktiviert TGase durch Entfernen des Hauptteils des Propeptids (41 AS, durch D...S gekennzeichnet), während die Ca^{2+} -stimulierte Tripeptidyl-Aminopeptidase TAP das Tetrapeptid FRAP in einem letzten Schritt vom reifen Enzym entfernt. Das TGase-Substrat SSTI ist ein Inhibitor von TAMEP, welcher gleichzeitig den Beginn der Proteinvernetzung regulieren kann. Die Abnahme von SSTI durch Quervernetzung könnte einen positiven Rückkopplungsmechanismus durch die sukzessive Erhöhung der TAMEP- und TGase-Aktivität in Gang setzen. Substratmodulatoren wie Lipoaminosäuren fördern wahrscheinlich durch Exposition zusätzlicher Glutamine die Bildung des Proteinnetzwerks von SSTI und schließen mögliche Lücken zwischen den Proteinbausteinen.

Die hier aufgezeigten mutmaßlichen biologischen Funktionen der TGase-Substrate sowie der Lipoaminosäuren und Lipopolyamine weisen auch auf ihr wirtschaftliches Potential hin. So könnten die Substrate Anwendung in der Medizintechnik finden, indem sie in Salben oder antibiotische Pflaster und Folien, die keine Wirkstoffe mehr freisetzen, eingearbeitet werden. Die hohe Stabilität der Wirkstoffe ermöglicht lange Lagerzeiten. Lipoaminosäuren und Lipopolyamine könnten vielfältig eingesetzt werden, wenn eine verbesserte Zugänglichkeit von TGase bei wenig oder unreaktiven Proteinen gezeigt werden kann. Die Frage erscheint auch interessant, inwieweit Acylpolyamine die Vernetzungsreaktion humaner TGasen beeinflusst. Schließlich machen bei neuronalen Zellen Polyamine bzw. deren Vorläufer, die Acylpolyamine, bis zu 1 Prozent der Gesamtmasse aus.

Mit der Entdeckung von SSTI und DAIP als TGase-Substrate wurden erste Hinweise auf die physiologische Funktion des Enzyms erbracht. In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Substrate tatsächlich in den Lufthyphen verankert sind. Dies wäre möglich, indem man Dünnschnitte von Kolonien anfertigt und die Substrate mit

spezifischen Antikörpern durch Farbstoff-konjugierte Zweitantikörper fluoreszenzmikroskopisch nachweist. Auch ein elektronenmikroskopischer Nachweis über Gold-konjugierte Zweitantikörper wäre denkbar. Außerdem kann mit den entdeckten Proteinen nun die Regulation auf genetischer Ebene untersucht werden. Dabei lässt sich auch die vorhandene Proteinsequenzinformation ergänzen, die für die Aufklärung der reaktiven Glutamin- und Lysinreste notwendig ist. Diese Arbeit wird auch dazu anregen, nach physiologischen Lipoaminosäuren oder Lipopolyaminen im Kulturmedium zu suchen und ihre Struktur aufzuklären. Diese haben wahrscheinlich wie analoge Moleküle anderer Lebewesen antibiotische Eigenschaften und werden möglicherweise die Entwicklung neuartiger Medizinprodukte initiieren. Mit der Entdeckung aber, dass intrinsische Substratmoleküle während der Kultivierung von *S. mobaraensis* durch TGase modifiziert werden, wird die Suche nach weiteren Substraten der TGase wesentlich vereinfacht. Alle Folgearbeiten, sei es auf DNA- oder Proteinebene, sollten dazu beitragen können, dass die zwischen *S. coelicolor* und *S. mobaraensis* sichtbaren Unterschiede, insbesondere was Lufthyphen- und Sporenstruktur betrifft, besser verstanden werden.

6. Literaturverzeichnis

- Adolf, F. (2007).** Aufreinigung und Charakterisierung eines Dispase inaktivierenden Proteins von *Streptomyces mobaraensis*. Diplomarbeit, Hochschule Darmstadt.
- Aeschlimann, D. & Paulsson, M. (1994).** Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb. Haemostasis* **71**, 402-415.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. & Motoki, M. (1989).** Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2613-2617.
- Andou, H., Matsuura, A. & Hirose, S. (1993).** Process for producing a transglutaminase derived from *Streptomyces*. U.S. Patent: 5,252,469.
- Anson, M.L. (1938).** The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with Hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-89.
- Ashikawa, N., Fukui, H., Toiguchi, S. & Motoki, M. (1990).** Transglutaminase-containing wheat and premix for cake, and manufacture of cake using them. Jpn Kokai Tokyo Koho JP 02286031
- Attwell, R.W., Cross, T. & Locci, R. (1973).** Fine structure of the spore sheath in *Streptoverticillium* species. *J. Gen. Microbiol.* **71**, 421-424.
- Baker, D., Shiau, A.K. & Agard, D.A. (1993).** The role of pro regions in protein folding. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 966-970.
- Baldacci, E. (1958).** Genus *Streptoverticillium*. In: Bergey's Manual of systematic bacteriology, **2**, Sektion 29.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, A., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- Bibb, M.J., Molle, V. & Buttner, M.J. (2000).** σ^{BldN} , an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **182**, 4606-4616.
- Blum, M., Beier, H. & Gross, H.J. (1987).** Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 349-351.
- Brana, A.F., Manzanal, M.B. & Hardisson, C. (1981).** Cytochemical and enzymatic characterization of the sporulation septum of *Streptomyces antibioticus*. *Can. J. Microbiol.* **27**, 1060-1065.
- Brana, A.F., Mendez, C., Diaz, L.A., Manzanal, M.B. & Hardisson, C. (1986).** Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1319-1326.
- Braun, P., Gerritse, G., van Dijk, J.-M. & Quax, W.J. (1999).** Improving protein secretion by engineering components of the bacterial translocation machinery. *Curr. Opin. Biotech.* **10**, 376-381.

- Bruton, C.J., Plaskitt, K.A. & Chater, K.F. (1995).** Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **18**, 89-99.
- Candi, E., Melino, G., Mei, G., Tarcsa, E., Chung, S.-I., Marekov, L.N. & Steinert, P.M. (1995).** Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J. Biol. Chem.* **44**, 26382-26390.
- Champness, W. (2000).** Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. In: Brun, Y.V. and Shimkets, L.J. (ed.), *Prokaryotic Development*. Washington, DC: ASM Press, p. 11-31.
- Chater, K.F. (1972).** A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 9-28.
- Chater, K.F. & Merrick, M.J. (1979).** *Streptomyces*. In: Parish, J.H. (ed.), *Developmental Biology of Prokaryotes*, Oxford, UK, Blackwell, pp. 93-114.
- Chater, K.F. (1989a).** Sporulation in *Streptomyces*. In: Smith, I., Slepecky, R. and Setlow, P. (ed.), *Regulation of Prokaryotic Development*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol., p. 277-299.
- Chater, K.F. (1989b).** Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.* **5**, 372-376.
- Chater, K.F., Bruton, C.J., Plaskitt, K.A., Buttner, M.J., Mendez, C. & Helmann, J.D (1989).** The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility sigma factor of *B. subtilis*. *Cell* **59**, 133-143.
- Chater, K.F. (1993).** Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 685-713.
- Chater, K.F. (1998).** Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* **144**, 1465-1478.
- Chater, K.F. (2001).** Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 667-673.
- Chater, K.F. & Horinouchi, S. (2003).** Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* **45**, 9-15.
- Chater, K.F. (2006).** *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**, 761-768.
- Chen, J.S. & Mehta, K. (1999).** Tissue transglutaminase: An enzyme with a split personality. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 817-836.
- Chung, S. & Folk, J.E. (1972).** Transglutaminase from hair follicle of guinea pig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 303-307.
- Claessen, D., Wösten, H.A.B., van Keulen, G., Faber, O.G., Alves, A.M.C.R., Meijer, W.G. & Dijkhuizen, L. (2002).** Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. *Mol. Microbiol.* **44**, 1483-1492.
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G.H., Dijkhuizen, L. & Wösten, H.A.B. (2003).** A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* **17**, 1714-1726.
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H.J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., Dijkhuizen, L. & Wösten, H.A.B. (2004).** The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between the rodlin and chaplin. *Mol. Microbiol.* **53**, 433-443.
- Clare, D.A., Gharst, G. & Sanders, T.H. (2007).** Transglutaminase polymerization of peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 432-438.

- Clarke, D.D., Mycek, M.J., Neidle, A. & Waelsch, H. (1957). The incorporation of amines into proteins. Arch. Biochem. Biophys. **79**, 338-354.
- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M. & Ousley, M.A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 3899-3905.
- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H. & Chen, J. (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. Food Chem. **105**, 612-618.
- Daza, M., Martin, J.F., Dominguez, A. & Gil, J.A. (1989). Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. J. Gen. Microbiol. **135**, 2483-2491.
- de Barros Soares, L.H., Assmann, F. & Ayub, M.A.Z. (2003). Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. Biotechnol. Appl. Biochem. **37**, 295-299.
- Del Duca, S. & Serafini-Fracassini, D. (2005). Transglutaminases of higher, lower plants and fungi. In: Mehta, K. & Eckert, R. (ed.), Transglutaminases family of enzymes with diverse functions. Prog. Exp. Tum. Res. Basel, Karger, **38**, pp 223-247.
- Demleitner, G. & Götz, F. (1994). Evidence for the importance of the *Staphylococcus hyicus* lipase pro-peptide in lipase secretion, stability and activity. FEMS Lett. Microbiol. **121**, 189-198.
- Dixon, M. (1953). The determination of the inhibition constants. Biochem. J. **55**, 170-171.
- Duran, R., Junqua, M., Schmitter, J.M., Gancet, C. & Goulas, P. (1998). Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamoneum* CBS 683.68. Biochimie **80**, 313-319.
- Economou, A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. Trends Microbiol. **8**, 315-320.
- Elliot, M., Damij, F., Passantino, R., Chater, K. & Leskiw, B.K. (1998). The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. J. Bacteriol. **180**, 1549-1555.
- Elliot, M.A., Bibb, M.J., Buttner, M.J. & Leskiw, B.K. (2001). BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Microbiol. **40**, 257-269.
- Elliot, M.A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M.J., Cohen, S.N., Kao, C.M. & Buttner, M.J. (2003). The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. Genes Dev. **17**, 1727-1740.
- Elliot, M.A. & Talbot, N.J. (2004). Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. Curr. Opin. Microbiol. **7**, 594-601.
- Fu, X., Inouye, M. & Shinde, U. (2000). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. J. Biol. Chem. **275**, 16871-16878.
- Folk, J.E. & Finlayson, J.S. (1977). The ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminases. Adv. Protein Chem. **31**, 1-133.
- Folk, J.E. (1980). Transglutaminase. Annu. Rev. Biochem. **49**, 517-531.
- Folk, J.E. & Chung, S.I. (1985). Transglutaminases. Methods Enzymol. **113**, 358-375.
- Frey-Klett, P., Garabaye, J. & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. **176**, 22-36.
- Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytol. **128**, 197-210.

- Gerber, U., Jucknischke, U., Putzien, S. & Fuchsbauer, H.-L. (1994).** A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Biochem. J.* **299**, 825-829.
- Goodfellow, M. & Cross, T. (1984).** Classification. In: Goodfellow, Mordarsky & Williams (ed.), *The biology of the actinomycetes*. Academic Press, London, 7-164.
- Grafe, U., Reinhardt, G., Krebs, D., Roth, M. & Bormann, E.J. (1982).** Biochemical characteristics of non-streptomycin-producing mutants of *Streptomyces griseus*. II. Lipids and fatty acid composition of vegetative mycelia. *Z. Allg. Mikrobiol.* **22**, 97-106.
- Grant, F.J., Taylor, D.A., Sheppard, P.O., Mathewes, S.L., Lint, W., Vanaja, E., Bishop, P.D. & O'Hara, P.J. (1994).** Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from a human prostate cDNA library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1117-1123.
- Greenberg, C.S., Birckbichler, P.J. & Rice, R.H. (1991).** Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* **5**, 3071-3077.
- Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C.M. (2002).** Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochem. J.* **368**, 377-396.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950).** The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagines. *J. Biol. Chem.* **187**, 111-125.
- Guijarro, J., Santamaria, R., Schauer, A. & Losick, R. (1988).** Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. *J. Bacteriol.* **170**, 1895-1901.
- Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. & Rainey, F.A. (1997).** Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 202-206.
- Hanlon, M.H. & Liener, I.E. (1986).** A kinetic analysis of the inhibition of rat and bovine trypsins by naturally occurring protease inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol. B* **84**, 53-57.
- Hardisson, C., Manzanal, M.B., Salas, J.A. & Suarez, J.E. (1978).** Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 203-214.
- Hiraga, K., Suzuki, T. & Oda, K. (2000).** A novel double-headed proteinaceous inhibitor for metalloproteinase and serine proteinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 25173-25179.
- Hiromi, K., Akasaka, K., Mitsui, Y., Tonomura, B. & Murao, S. (1985).** Protein protease inhibitor – the case of *Streptomyces subtilisin* inhibitor (SSI). Elsevier/North Holland Publishing, Amsterdam.
- Hodgson, D.A. (1992).** Differentiation in actinomycetes. In: S. Mohan, C. Dow, and J.A. Cole (ed.), *Prokaryotic structure and function*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 407-440.
- Holmquist, B. & Vallee, B.L. (1974).** Metal substitutions and inhibition of thermolysin: spectra of the cobalt enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**, 4601-4607.
- Horiguchi, Y., Inoue, N., Masuda, M., Kashimoto, T., Katahira, J., Sugimoto, N. & Matsuda, M. (1997).** *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibres through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11623-11626.
- Horinouchi, S. & Beppu, T. (1994).** A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **12**, 859-864.
- Horinouchi, S. (1996).** *Streptomyces* genes involved in aerial mycelium formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 1-9.

- Huang, Y.P., Seguro, K., Motoki, M. & Tawada, K. (1992). Cross-linking of contractile proteins from skeletal muscle by treatment with microbial transglutaminase. *J. Biochem.* **112**, 229-234.
- Hubbard, T.J.P., Ailey, B., Brenner, S.E., Murzin, A.G. & Chothia, C. (1999). SCOP: a structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 254-256.
- Hudson, M.E., Zhang, D. & Nodwell, J.R. (2002). Membrane association and kinase-like motifs of the RamC protein of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **184**, 4920-4924.
- Hudson, M.E. & Nodwell, J.R. (2004). Dimerization of the RamC morphogenetic protein of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **186**, 1330-1336.
- Icekson, I. & Apelbaum, A. (1987). Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol.* **84**, 972-972.
- Kalakoutskii, L.V. & Agre, N.S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* **40**, 469-524.
- Kamiya, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Takazawa, T., Takeda, S., Watanabe, K. & Nagamune, T. (2003). S-peptide as a potent peptidyl linker for protein cross-linking by microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biocon. Chem.* **14**, 351-357.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, K., Ide, H., Motoki, M. & Simonishi, Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112. *J. Biol. Chem.* **268**, 11565-11572.
- Kang, H. & Cho, Y.D. (1996). Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 288-292.
- Kang, I.J., Matsumura, Y., Ikura, K., Motoki, M., Sakamoto, H. & Mori, T. (1994). Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 159-165.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K.-I., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. & Suzuki, E.-I. (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.* **277**, 44252-44260.
- Kasymbekova, S.K. & Konova, I.V. (1979). Lipoamino acids in the composition of actinomycete polar lipids. *Mikrobiologija* **48**, 809-813.
- Kato, A., Wada, T., Kobayashi, K., Seguro, K. & Motoki, M. (1991). Ovomucin – food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1027-1031.
- Kato, J., Suzuki, A., Yamazaki, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2002). Control by A-factor of a metalloendopeptidase gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **184**, 6016-6025.
- Kato, J., Chi, W.-J., Ohnishi, Y., Hong, S.-K. & Horinouchi, S. (2005). Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**, 286-295.
- Keijser, B.J.F., van Wezel, G.P., Canters, G.W. & Vijgenboom, E. (2002). Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* ram genes: involvement of RamR in regulation of the ramCSAB Operon. *J. Bacteriol.* **184**, 4420-4429.
- Kelemen, G.H. & Buttner, M.J. (1998). Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 656-662.
- Kelemen, G.H., Viollier, P.H., Tenor, J., Marri, L., Buttner, M.J. & Thompson, C.J. (2001). A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **40**, 804-814.

- Khyse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Kim, I.S., Kim, Y.B. & Lee, K.J. (1998).** Characterization of the leupeptin-inactivating enzyme from *Streptomyces exfoliatus* SMF13 which produces leupeptin. *Biochem. J.* **331**, 539-545.
- Klein, J.D., Guzman, E. & Kuehn, G.D. (1992).** Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *J. Bacteriol.* **174**, 2599-2605.
- Kobayashi, K., Kumazawa, Y., Miwa, K. & Yamanaka, S. (1996).** ϵ -(γ -Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 157-160.
- Kobayashi, K., Suzuki, S.-I., Izawa, Y., Yokozeki, K., Miwa, K. & Yamanaka, S. (1998a).** Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 85-91.
- Kobayashi, K., Hashiguchi, K., Yokozeki, K. & Yamanaka, S. (1998b).** Molecular cloning of the transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1109-1114.
- Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R. & Willey, J.M. (2004).** The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11448-11453.
- Kojima, S., Terabe, M., Taguchi, S., Momose, H. & Miura, K. (1994).** Primary structure and inhibitory properties of a proteinase inhibitor produced by *Streptomyces cacaoi*. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 120-125.
- Kojima, S., Kumazaki, T., Ishii, S.-I. & Miura, K. (1998).** Primary structure of *Streptomyces griseus* metalloendopeptidase II. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1392-1398.
- Koreishi, M., Tani, K., Ise, Y., Imanaka, H., Imamura, K. & Nakanishi, K. (2007).** Enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics and *N*-fatty-acylated amino compounds by the acyl-transfer reaction catalyzed by penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1582-1586.
- Korn-Wendisch, F. & Kutzner, H.J. (1981).** The family Streptomycetaceae. In: *The Prokaryotes* **2**, Springer-Verlag, Stuttgart, 921-995.
- Kumazaki, T., Ishii, S.-I. & Yokosawa, H. (1994).** Inhibition of *Streptomyces griseus* metallo-endopeptidase II (SGMP-II) by active-site-directed inhibitors. *J. Biochem.* **115**, 532-535.
- Kuramoto, A., Lezhava, A., Taguchi, S., Momose, H. & Kinashi, H. (1996).** The location and deletion of the genes which code for SSI-like protease inhibitors in *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**, 37-42.
- Kutzner, H.J., Bottinger, V. & Heitzner, R.D. (1978).** The use of physiological criteria in the taxonomy of *Streptomyces* and *Streptoverticillium*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Abt. Suppl.* **6**, 25-29.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langston, J., Blinkovsky, A., Byun, T., Terribilini, M., Ransbarger, D. & Xu, F. (2007).** Substrate specificity of *Streptomyces* transglutaminases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **136**, 291-308.
- Lin, Y.-S., Chao, M.-L., Liu, C.-H., Tseng, M. & Chu, W.-S. (2006).** Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Process Biochem.* **41**, 519-524.

- Liu, X., Yang, X., Xie, F. & Qian, S. (2006).** Cloning of transglutaminase gene from *Streptomyces fradiae* and its enhanced expression in the original strain. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1319-1325.
- Locci, R. & Sharples, G.P. (1984).** Morphology. In: Goodfellow, M., Mordarski, M. and Williams, S.T. (ed.), *The biology of the actinomycetes*. Academic Press Inc. (London) Ltd., London, p. 165-199.
- Lorand, L., Ong, H.H., Lipinski, B., Rule, N.G., Downey, J. & Jacobsen, A. (1966).** Lysine as amine donor in fibrin crosslinking. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 629-637.
- Lorand, L. & Conrad, S.M. (1984).** Transglutaminases. *Mol. Cell Biochem.* **58**, 9-35.
- Lorand, L. & Graham, R.M. (2003).** Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 140-156.
- Ma, H. & Kendall, K. (1994).** Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **176**, 3800-3811.
- Maier, A., Riedlinger, J., Fiedler, H.-P. & Hampp, R. (2004).** Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic, and plant parasitic soil fungi in dual culture. *Mycol. Progr.* **3**, 129-136.
- Makarova, K.S., Aravind, L. & Koonin, E.V. (1999).** A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Science* **8**, 1714-1719.
- Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2005a).** A death round affecting a young compartmentalised mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology* **151**, 3689-3697.
- Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2005b).** Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiol.* **5**, 51.
- Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2006).** Cytological and biochemical evidence for an early event of cellular dismantling in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Res. Microbiol.* **157**, 143-152.
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C. & Sanchez, J. (2007).** Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**, 118-125.
- Marraffini, L.A. & Schneewind O. (2006).** Targeting proteins to the cell wall of sporulating *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **62**, 1402-1417.
- Margosiak, S.A., Dharma, A., Bruce-Carver, M.R., Gonzales, A.P., Louie, D. & Kuehn, G.D. (1990).** Identification of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L (alfalfa). *Plant Physiol.* **92**, 88-96.
- Matsudaira, P. (1987).** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H. & Schneewind, O. (1999).** *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **285**, 760-763.
- Mehta, K. (2005).** Mammalian transglutaminases: a family portrait. In: Mehta, K. & Eckert, R. (ed.), *Transglutaminases family of enzymes with diverse functions*. Prog. Exp. Tum. Res. Basel, Karger, **38**, pp 1-18.
- Metha, K. & Eckert, R. (2005).** Transglutaminases family of enzymes with diverse functions. Prog. Exp. Tum. Res. Bael, Karger, **38**.

- Méndez, C., Brana, A.F., Manzanal, M.B. & Hardisson, C. (1985).** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 446-450.
- Merrick, M.J. (1976).** A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **96**, 299-315.
- Miguélez, E.M., Martin, C., Manzanal, M.B. & Hardisson, C. (1992).** Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 351-359.
- Miguélez, E.M., Garcia, M., Hardisson, C. & Manzanal, M.B. (1994).** Autoradiographic study of hyphal growth during aerial mycelium development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **176**, 2105-2107.
- Miguélez, E.M., Hardisson, C. & Manzanal, M.B. (2000).** Streptomycetes: a new model to study cell death. *Internat. Microbiol.* **3**, 153-158.
- Monroe, A. & Setlow, P. (2006).** Localization of the transglutaminase cross-linking sites in the *Bacillus subtilis* spore coat protein GerQ. *J. Bacteriol.* **188**, 7609-7616.
- Murao, S., Sato, S. & Muto, N. (1972).** Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1737-1744.
- Nakamura, K., Yahagi, S.-I., Yamazaki, T. & Yamane, K. (1999).** *Bacillus subtilis* histone-like protein, Hbsu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 13569-13576.
- Navarre, W.W. & Schneewind, O. (1999).** Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Res.* **63**, 174-229.
- Nguyen, K.T., Willey, J.M., Nguyen, L.D., Nguyen, L.T., Viollier, P.H. & Thompson, C.J. (2002).** A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **46**, 1223-1238.
- Nguyen, K.T., Tenor, J., Stettler, H., Nguyen, L.T., Nguyen, L.D. & Thompson, C.J. (2003).** Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene. *J. Bacteriol.* **185**, 7291-7296.
- Nicieza, R.G., Huergo, J., Connolly, B.A. & Sanchez, J. (1999).** Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 20366-20375.
- Nodwell, J.R., Yang, M., Kuo, D. & Losick, R. (1999).** Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **151**, 569-584.
- Noguchi, T., Tanimoto, H., Motoki, M. & Mori, M. (1992).** A promoting material for absorption of minerals and compositions containing it. *Jpn Kokai Tokyo Koho JP 04349869*
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K. & Matsuura, A. (1989).** Polymerization of several proteins by Ca²⁺-independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2619-2623.
- Nonaka, M., Soeda, T., Yamagiwa, K., Kobata, H., Motoki, M. & Toiguchi, S. (1990).** Tofu for long-term storage and its manufacture using a novel enzyme. *Jpn Kokai Tokyo Koho JP 0269155*
- Nozawa, H., Mamegoshi, S. & Seki, N. (1997).** Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **118**, 313-317.
- Obata, S., Taguchi, S., Kumagai, I. & Miura, K. (1989).** Molecular cloning and nucleotide sequence determination of gene encoding *Streptomyces subtilisin* inhibitor (SSI). *J. Biochem.* **105**, 357-371.

- O'Connor, T.J., Kanellis, P. & Nodwell, J.R. (2002). The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Mol. Microbiol.* **45**, 45-57.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H. & Horinouchi, S. (1999). The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**, 102-111.
- Ohnishi, Y., Seo, J.-W. & Horinouchi, S. (2002). Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**, 1-7.
- Ohta, Y. & Inouye, M. (1990). Pro-subtilisin E: purification and characterization of its autoprocessing to active subtilisin E *in vitro*. *Mol. Microbiol.* **4**, 295-304.
- Ohtsuka, T., Ota, M., Nio, N. & Motoki, M. (2000). Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2608-2613.
- Ohtsuka, T., Umezawa, Y., Nio, N. & Kubota, K. (2001). Comparison of deamidation activity of transglutaminases. *J. Food Sci.* **66**, 25-29.
- Okami, Y. & Hotta, K. (1988). Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London, p. 33-67.
- Ota, M., Sawa, A., Nio, N. & Ariyoshi, Y. (1999). Enzymatic ligation for synthesis of single-chain analogue of monellin by transglutaminase. *Biopolymers* **50**, 193-200.
- Pasternack, R., Laurent, H.-P., R  th, T., Kaiser, A., Schön, N. & Fuchsbauer, H.-L. (1997). A fluorescent substrate of transglutaminase for detection and characterization of glutamine acceptor compounds. *Anal. Biochem.* **249**, 54-60.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J.T., Robenek, I.R., Wolf, S. & Fuchsbauer, H.-L. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*: purification, characterisation and sequence of the zymogen. *Eur. J. Biochem.* **257**, 570-576.
- Pasternack, R. (1998). Mikrobielle Transglutaminase von *Streptoverticillium* spezie: Nachweis, Charakterisierung und Regulationsmechanismus der Enzyme. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Pedersen, L.C., Yee, V.C., Bishop, P.D., Le Trong, I., Teller, D.C. & Stenkamp, R.E. (1994). Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Sci.* **3**, 1131-1135.
- Pereira, L.S., Silva, P.I. Jr., Miranda, M.T., Almeida, I.C., Naoki, H., Konno, K. & Daffre, S. (2007). Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 953-959.
- Piret, J.M. & Demain, A.L. (1988). Actinomycetes in biotechnology: an overview. In: Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London, p. 461-482.
- Poduslo, J.F. (1981). Glycoprotein molecular-weight estimation using sodium dodecyl sulphate-pore gradient electrophoresis: comparison of tris-glycine and tris-borate-EDTA buffer systems. *Anal. Biochem.* **114**, 131-139.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T.F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**, 458-462.
- Poole, E.J., Bending, G.D., Whipps, J.M. & Read, D.J. (2001). Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhiza and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytol.* **151**, 743-751.

- Ragkousi, K. & Setlow, P. (2004).** Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* **186**, 5567-5575.
- Rao, R.U., Chandrashekar, R. & Mehta, K. (2005).** Transglutaminases of lower organisms. In: Mehta, K. & Eckert, R. (ed.), Transglutaminases family of enzymes with diverse functions. *Prog. Exp. Tum. Res.* Basel, Karger, **38**, pp 209-222.
- Redinbaugh, M.G. & Turley, R.B. (1986).** Adaption of the bicinchoninic acid protein assay for use with microwell plates and sucrose gradient fractions. *Anal. Biochem.* **153**, 267-271.
- Ruiz-Herrera, J., Iranzo, M., Elorza, M.V., Sentandreu, R. & Mormeneo, S. (1995).** Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* **164**, 186-193.
- Sakamoto, H. & Soeda, T. (1991).** Minced meat products containing transglutaminase. *Jpn Kokai Tokyo Koho JP 03175929*
- Sakamoto, H., Nonaka, M. & Motoki, M. (1994).** Calcium-independent transglutaminase derived from a microorganism: its characteristics and capability in protein crosslinking and gel formation. *Food Hydrocolloids: Structures, properties, and functions*, Plenum Press, New York, 383-386.
- Sarafeddin, A., Schmidt, S., Adolf, F., Mainusch, M., Bender, A. & Fuchsbaier, H.-L. (2008).** A novel transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis* triggers autolysis of neutral metalloproteases. Manuscript.
- Sarkar, N.K., Clarke, D.D. & Waelsch, H. (1957).** An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 451-452.
- Sato, H., Hayashi, E., Yamada, N., Yatagai, M. & Takahara, Y. (2001).** Further studies on the site-specific protein modification by microbial transglutaminase. *Bioconj. Chem.* **12**, 701-710.
- Schleicher, M. & Watterson, D.M. (1983).** Analysis of differences between Coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: Conditions for the detection of calmodulin and troponin C. *Anal. Biochem.* **131**, 312-317.
- Schmidt, G., Selzer, J., Lerm, M. & Aktories, K. (1998).** The Rho-deamidating Cytotoxic Necrotizing Factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 13669-13674.
- Schrey, S.D. & Tarkka, M.T. (2008).** Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie van Leeuwenhoek*, in print, epub ahead of print.
- Seguro, K. & Motoki, M. (1991).** Manufacture of canned meats containing transglutaminase. *Jpn Kokai Tokyo Koho JP 03210144*
- Serafini-Fracassini, D., Duca, S.D. & D'Orazi, D. (1988).** First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymic activity in plants. *Plant Physiol.* **87**, 757-761.
- Sharma, R., Lorenzen, P.C. & Qvist, K.B. (2001).** Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. *Int. Dairy J.* **11**, 785-793.
- Shimba, N., Yokoyama, K. & Suzuki, E. (2002).** NMR-based screening method for transglutaminases: rapid analysis of their substrate specificities and reaction rates. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1330-1334.
- Shirling, E.B. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. System. Bacteriol.* **16**, 313-340.
- Simonen, M. & Palva, I. (1993).** Protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **57**, 109-137.

- Singh, R.N. & Mehta, K. (1994).** Purification and characterization of a novel transglutaminase from filarial nematode *Brugia malayi*. *Eur. J. Biochem.* **225**, 625-634.
- Siu, N.C., Ma, C.Y., Mock, W.Y. & Mine, Y. (2002).** Functional properties of oat globulin modified by a calcium-independent microbial transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2666-2672.
- Skovbjerg, H., Norén, O., Anthonsen, D., Moller, J. & Sjöström, H. (2002).** Gliadin is a good substrate of several transglutaminases: possible implication in the pathogenesis of coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **37**, 812-817.
- Slaughter, T.F., Achyuthan, K.E., Lai, T.-S. & Greenberg, C.S. (1992).** A microtiter plate transglutaminase assay utilizing 5-(biotinamido)pentylamine as substrate. *Anal. Biochem.* **205**, 166-171.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Soeda, T., Sakamoto, H. & Nonaka, M. (1992).** Manufacture of plant protein powders with emulsifiers and transglutaminase. *Jpn Kokai Tokyo Koho JP 0479842*
- Sorensen, K. & Brodbeck, U. (1986).** A sensitive protein assay method using micro-titer plates. *Experientia* **42**, 161-162.
- Stackebrandt, E. & Woese, C.R. (1984).** The phylogeny of prokaryotes. *Microbiol. Sci.* **1**, 117-122.
- Staib, F., Mishra, S.K. & Blisse, A. (1980).** Interaction between *Aspergilli* and *Streptomyces* in the soil of potted indoor plants: a preliminary report (contribution to the epidemiology of human aspergillosis). *Mycopathologia* **70**, 9-12.
- Straight, P.D., Willey, J.M. & Kolter, R. (2006).** Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: role of surfactants in raising aerial structures. *J. Bacteriol.* **188**, 4918-4925.
- Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K. & Yokozeki, K. (2000).** Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2344-2351.
- Taguchi, S., Kojima, S., Kumagai, I., Ogawara, H., Miura, K. & Momose, H. (1992).** Isolation and partial characterization of SSI-like protease inhibitors from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**, 293-298.
- Taguchi, S., Kikuchi, H., Kojima, S., Kumagai, I., Nakase, T., Miura, K. & Momose, H. (1993a).** High frequency of SSI-like protease inhibitors among *Streptomyces*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 522-524.
- Taguchi, S., Kikuchi, H., Suzuki, M., Kojima, S., Terabe, M., Miura, K., Nakase, T. & Momose, H. (1993b).** *Streptomyces* subtilisin inhibitor-like proteins are distributed widely in streptomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4338-4341.
- Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Miura, K. & Momose, H. (1994).** Comparative studies on the primary structures and inhibitory properties of subtilisin-trypsin inhibitors from *Streptomyces*. *Eur. J. Biochem.* **220**, 911-918.
- Taguchi, S. (1995a).** Communication between protease and protease inhibitor in the *Streptomyces* world. *Actinomycetologica* **9**, 216-227.
- Taguchi, S., Odaka, A., Watanabe, Y. & Momose, H. (1995b).** Molecular characterization of a gene encoding extracellular serine protease isolated from a subtilisin inhibitor-deficient mutant of *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 180-186.

- Taguchi, S., Suzuki, M., Kojima, S., Miura, K. & Momose, H. (1995c).** *Streptomyces* serine protease (SAM-P20): recombinant production, characterization, and interaction with endogenous protease inhibitor. *J. Bacteriol.* **177**, 6638-6643.
- Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Kumazawa, Y., Kohriyama, H., Suzuki, M., Miura, K. & Momose, H. (1997).** Molecular phylogenetic characterization of *Streptomyces* protease inhibitor family. *J. Mol. Evol.* **44**, 542-551.
- Taguchi, S., Nishihama, K.I., Igi, K., Ito, K., Taira, H., Motoki, M. & Momose, H. (2000).** Substrate specificity analysis of microbial transglutaminase using proteinaceous protease inhibitors as natural model substrates. *J. Biochem.* **128**, 415-425.
- Tani, T., Iwamoto, K., Motoki, M. & Toiguchi, S. (1990).** Manufacture of shark fin imitation food. *Jpn Kokai Tokyo Koho JP 02171160*
- Takano, E., Tao, M., Long, F., Bibb, M.J., Wang, L., Li, W., Buttner, M.J., Bibb, M.J., Deng, Z.X. & Chater, K.F. (2003).** A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **50**, 475-486.
- Terabe, M., Kojima, S., Taguchi, S., Momose, H. & Miura, K. (1994).** Primary structure and inhibitory properties of a subtilisin-chymotrypsin inhibitor from *Streptomyces virginiae*. *Eur. J. Biochem.* **226**, 627-632.
- Terabe, M., Kojima, S., Taguchi, S., Momose, H. & Miura, K. (1996).** New subtilisin-trypsin inhibitors produced by *Streptomyces*: primary structure and their relationships to other protease inhibitors from *Streptomyces*. *Biochim. Biophys Acta* **1292**, 233-240.
- Terada, I., Kwon, S.T., Miyata, Y., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1990).** Unique precursor structure of an extracellular protease, aqualysin I, with NH₂- and COOH-terminal pro-sequences and its processing in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 6576-6581.
- Tillotson, R.D., Wösten, H.A.B., Richter, M. & Willey, J.M. (1998).** A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Mol. Microbiol.* **30**, 595-602.
- Tokunga, F., Muta, T., Iwanga, S., Ichinose, A., Davie, E.W., Kuma, K. & Mikata, T. (1993).** *Limulus* hemocyte transglutaminase – cDNA cloning, amino acid sequence and tissue localization. *J. Biol. Chem.* **268**, 262-268.
- Tomono, A., Tsai, Y., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2005).** Three chymotrypsin genes are members of the *AdpA* regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**, 6341-6353.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tsuyuki, H., Kajiwara, K., Fujita, A., Kumazaki, T. & Ishii, S.-I. (1991).** Purification and characterization of *Streptomyces griseus* metalloendopeptidase I and II. *J. Biochem.* **110**, 339-344.
- Ueda, K., Miyake, K., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1993).** A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. *J. Bacteriol.* **175**, 2006-2016.
- Ueda, K., Oinuma, K., Ikeda, G., Hosono, K., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. & Beppu, T. (2002).** AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **184**, 1488-1492.

- Uehara, Y., Tonomura, B. & Hiromi, K. (1983). Kinetic studies on acid denaturation and renaturation of a protein proteinase inhibitor, *Streptomyces subtilisin* inhibitor. J. Biochem. **94**, 903-915.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Kunimoto, S. & Matsuzaki, M. (1970). Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. J. Antibiot. (Tokyo) **23**, 425-427.
- Umezawa, Y., Ohtsuka, T., Yokoyama, K. & Nio, N. (2002). Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces* sp.. Food Sci. Technol. Res. **8**, 113-118.
- van Roosmalen, M.L., Geukens, N., Jongbloed, J.D.H., Tjalsma, H., Dubois, J.-Y.F., Bron, S., van Dijk, J.M. & Anné, J. (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. Biochim. Biophys. Acta **1694**, 279-297.
- Voelskow, H. (1989). Methoden der zielorientierten Stammsolierung. Jahrbuch Biotechnologie, Carl Hanser Verlag, München, 343-361.
- Wakameda, A., Ichihara, Y., Toiguchi, S. & Motoki, M. (1990). Manufacture of fish meat paste with transglutaminase as phosphate substitute. Jpn Kokai Tokyo Koho JP 02100653
- Wandersman, C. (1989). Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. Mol. Microbiol. **3**, 1825-1831.
- Washizu, K., Ando, K., Kokeda, S., Hirose, S., Matsuura, A., Takagi, H., Motoki, M. & Takeuchi, K. (1994). Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **58**, 82-87.
- Weimer, S., Oertel, K. & Fuchsbauer, H.-L. (2006). A quenched fluorescent Dipeptide for assaying disperse- and thermolysin-like metalloproteases. Anal. Biochem. **352**, 110-119.
- Weraarchakul-Boonmark, N., Jeong, J.M., Murthy, S.N.P., Engel, J.D. & Lorrain, L. (1992). Cloning and expression of chicken erythrocyte transglutaminase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 9804-9808.
- Wildermuth, H. (1970). Development and organisation of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Microbiol. **60**, 43-50.
- Wildermuth, H. & Hopwood, D.A. (1970). Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Microbiol. **60**, 51-59.
- Willey, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M. & Losick, R. (1991). Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. Cell **65**, 641-650.
- Willey, J.M., Willems, A., Kodani, S. & Nodwell, J.R. (2006). Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. Mol. Microbiol. **59**, 731-742.
- Witt, D. & Stackebrandt, E. (1990). Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}. Syst. Appl. Microbiol. **13**, 361-371.
- Wong, W.S., Batt, C. & Kinsella, J.E. (1990). Purification and characterization of rat liver transglutaminase. Int. J. Biochem. **22**, 53-59.
- Yamanaka, F. & Sakai, K. (1992). Low-calorie sweet foods containing transglutaminase-treated proteins. Jpn Kokai Tokyo Koho JP 04144643
- Yamazaki, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2000). An A-factor-dependent extracytoplasmatic function sigma factor (σ^{AdsA}) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. **182**, 4596-4605.
- Yang, S.S. & Huang, C.I. (1994). Protease production by amylolytic fungi in solid state fermentation. J. Chin. Agric. Chem. Soc. **32**, 589-601.

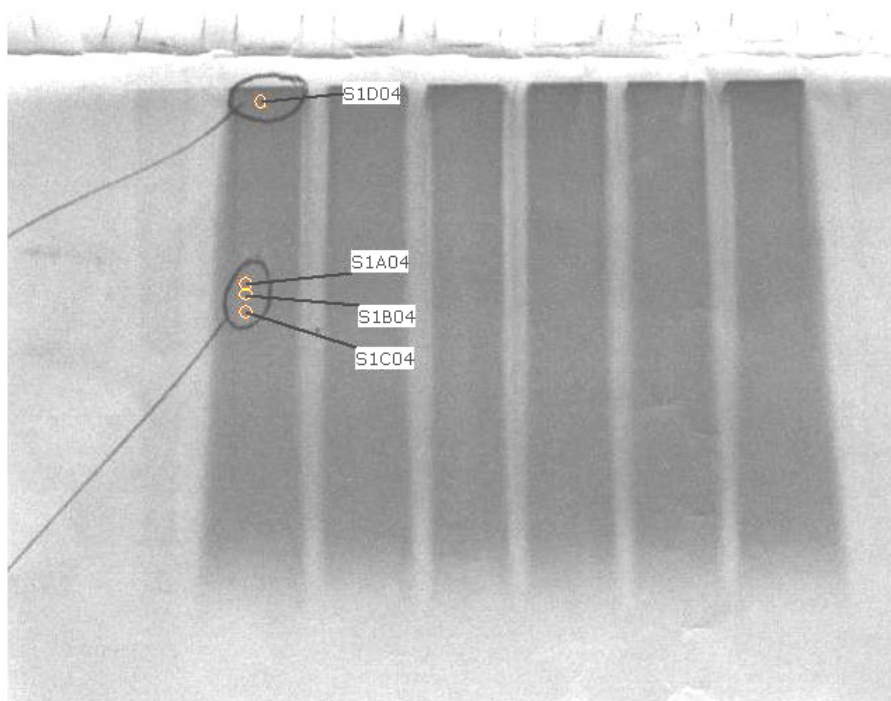
- Yasueda, H., Kumazawa, Y. & Motoki, M. (1994).** Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 2041-2045.
- Yokoyama, K., Nio, N. & Kikuchi, Y. (2004).** Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 447-454.
- Yuan, W.M. & Crawford, D.L. (1995).** Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3119-3128.
- Zhang, D., Wang, M., Du, G., Zhao, Q., Wu, J. & Chen, J. (2008).** Surfactant protein of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor family inhibits transglutaminase activation in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3403-3408.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J. & Bol, J. (1995).** Microbial transglutaminase – a review of its production and applications in food processing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 277-282.
- Zilhão, R., Isticato, R., Martins, L.O., Steil, L., Völker, U., Ricca, E., Moran, Jr., C.P. & Henriques, A.O. (2005).** Assembly and function of a spore coat-associated transglutaminase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**, 7753-7764.
- Zotzel, J. (2002).** Aktivierung von Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis* und ihre Regulation. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Zotzel, J., Keller, P. & Fuchsbauer, H.-L. (2003a).** Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3214-3222.
- Zotzel, J., Pasternack, R., Pelzer, C., Ziegert, D., Mainusch, M. & Fuchsbauer, H.-L. (2003b).** Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4149-4155.

7. Anhang

7.1 Identifizierung von Proteinen aus dem Zellwandolymer von *Streptomyces mobaraensis*

Kurzbericht vom NMI, Reutlingen:

Photo 2



Für die Proben S1A04, S1B04 und S1D04 konnten MS/MS Daten generiert und ausgewertet werden. Für die Proben S1C04 liegen keine Daten vor.

2. Massenspektrometrische Identifizierung

MASCOT Suchparameter:

Type of search: MS/MS Ion Search

Enzyme: Trypsin

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Mass values: Monoisotopic

Protein Mass: Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da
 Max Missed Cleavages: 1
 Instrument type: Default
 Number of queries: 193

2.1. Mascot Ergebnisse für Probe S1A04

AccNo:	Proteinbezeichnung [Spezies]	Ranking	Zahl Peptide
gi 6653059	elongation factor Tu1 [Streptomyces mobaraensis]	397	7
gi 231753	60 kDa chaperonin 2 (Protein Cpn60 2) (groEL protein 2) (HSP56)	285	6
gi 21220265	putative L-alanine dehydrogenase [Streptomyces coelicolor A3(2)]	156	3
gi 4335681	ribosomal protein S2 [Streptomyces coelicolor A3(2)]	133	3
gi 3318722	Chain E, Leech-Derived Trypsin InhibitorTRYPSIN COMPLEX	133	3
gi 21220480	30S ribosomal protein S1 [Streptomyces coelicolor A3(2)]	124	3
gi 54027049	putative translation elongation factor TU [Nocardia farcinica IFM 10152]	121	3
gi 68173871	Translation elongation factor Tu:Small GTP-binding protein domain [Frankia sp. Ccl3]	106	3

.

2.2. Mascot Ergebnisse für Probe S1B04

AccNo:	Proteinbezeichnung [Spezies]	Ranking	Zahl Peptide
gi 231753	60 kDa chaperonin 2 (Protein Cpn60 2) (groEL protein 2) (HSP56)	240	7
gi 6653059	elongation factor Tu1 [Streptomyces mobaraensis]	174	4

2.3. Mascot Ergebnisse für Probe S1D04

AccNo:	Proteinbezeichnung [Spezies]	Ranking	Zahl Peptide
gi 1707675	elongation factor Tu [Streptomyces cinnamoneus]	266	8

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2004 bis Juni 2008 am Fachbereich Chemie- und Biotechnologie der Hochschule Darmstadt unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer vom Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

Bei Prof. Dr. H.-L. Fuchsbauer möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, auch nach Ablauf der Finanzierung, die vielen hilfreichen Diskussionen, Denkanstöße, sowie seine fachliche Unterstützung bedanken.

Frau Prof. Dr. F. Pfeifer möchte ich für Ihre Diskussionsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit, sowie Ihre Unterstützung bei den molekularbiologischen Versuchen danken, die leider nicht zu den gewünschten Ergebnissen geführt haben.

Herrn Prof. Dr. R. Kaldenhoff danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein Dankeschön geht an Martina Mainusch, Ulrike Becher und Alla Sarafeddinov für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und gute Arbeitsatmosphäre. Bei Alla bedanke ich mich besonders für die Entdeckung und erste Charakterisierung, bei Martina für die GPC-Analysen von DAIP, das erst später ins Interesse meiner Arbeit rückte. Auch bei den Diplomandinnen Katja Berscht, Kristin Rauschenbach und Atia Arif, der Bachelor-Studentin Jaimy Alex aus Vellore, Indien und Catherine Lizama aus Oslo, Norwegen möchte ich mich für die nette Atmosphäre im Labor und den Gedankenaustausch bedanken. Besonderer Dank gilt Frank Adolf für die weitere Charakterisierung von DAIP im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Bei Dr. Dieter Stoll vom NMI in Reutlingen möchte ich mich für die Durchführung der Proteinsequenzanalysen bedanken.

Den Firmen N-Zyme BioTec und Zedira, besonders Dr. Jens Zotzel und Dr. Ralf Pasternack, möchte ich für die Möglichkeit der Nutzung von Protarmor und einem pflanzlichen Lectin sowie die finanzielle Unterstützung danken.

Den Mitgliedern der AG Pfeifer, vor allem Sandra Scheuch und Katharina Teufel, gilt mein Dank für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten und für die nette Atmosphäre im Labor. Bei Marie Lippert von der AG Heider möchte ich mich für die netten Gespräche bedanken.

Dem Zentrum für Forschung und Entwicklung der Hochschule Darmstadt sowie Prof. Dr. V. Wiskamp danke ich für die Teilfinanzierung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Verlobten Jens Schüßler für seine Unterstützung, endlose Geduld, die unzähligen Ermutigungen und liebevollen Ablenkungen. Ohne seine Motivation auch in schwierigen Phasen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich trotz der großen Entfernung immer unterstützt haben. Und auch meiner Schwester möchte ich für die vielen Aufmunterungen danken.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Susan Schmidt
Geburtstag:	26.11.1978
Geburtsort:	Großröhrsdorf

Schul Ausbildung

1985 – 1991	Oberschule Großröhrsdorf
1991 – 1995	Mittelschule Großröhrsdorf
1995	Realschulabschluss
1995 – 1998	Berufliches Gymnasium am BSZ Kamenz
1998	Abitur

Akademische Ausbildung

1998 – 2004	Studium der Biologie an der Universität Rostock
2004	Diplomarbeit bei Frau Dr. G. Berg an der Universität Rostock Titel: „Genotypische und phänotypische Charakterisierung fluoreszierender, 2,4-Diacetylphloroglucinol-produzierender Pseudomonaden“
2004	Abschluss des Studium der Biologie an der Universität Rostock als Diplom-Biologin
2004 – 2008	Promotion bei Prof. Dr. H.-L. Fuchsbauer an der Hochschule Darmstadt in Kooperation mit Frau Prof. Dr. F. Pfeifer von der Technischen Universität Darmstadt Titel: „Intrinsische Substratproteine der Transglutaminase von <i>Streptomyces mobaraensis</i> : Identifizierung und Charakterisierung“

7.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Darmstadt, den 13.06.2008

Susan Schmidt